

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Ecología



TESIS DOCTORAL

ECOSISTEMAS MICROBIANOS ENDOLÍTICOS EN NÓDULOS SUPERFICIALES DE HALITA DEL DESIERTO HIPERÁRIDO DE ATACAMA: MICROCLIMA, MICROHÁBITAT Y BIODIVERSIDAD

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sergio Valea Peces

Directores

María Asunción de los Ríos Murillo
Jacek Wierzbos

Madrid, 2016

Hay un lugar sobre la tierra donde prácticamente no llueve jamás, donde los rayos del sol caen implacables sobre el suelo desnudo, donde la vida parece no haber existido. Sin embargo, este lugar, el más seco del planeta, también esconde los más fascinantes secretos de la naturaleza (Barros, 1983)

ECOSISTEMAS MICROBIANOS ENDOLÍTICOS EN NÓDULOS SUPERFICIALES DE HALITA DEL DESIERTO HIPERÁRIDO DE ATACAMA: MICROCLIMA, MICROHÁBITAT Y BIODIVERSIDAD

Sergio Valea Peces

TESIS DOCTORAL
Madrid, 2015

ECOSISTEMAS MICROBIANOS ENDOLÍTICOS EN NÓDULOS SUPERFICIALES DE HALITA DEL DESIERTO HIPERÁRIDO DE ATACAMA: MICROCLIMA, MICROHÁBITAT Y BIODIVERSIDAD

Sergio Valea Peces

TESIS DOCTORAL
Madrid, 2015



Departamento de Ecología - UCM
Museo Nacional de Ciencias Naturales - CSIC

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Ecología



TESIS DOCTORAL

ECOSISTEMAS MICROBIANOS ENDOLÍTICOS EN NÓDULOS SUPERFICIALES DE HALITA DEL DESIERTO HIPERÁRIDO DE ATACAMA: MICROCLIMA, MICROHÁBITAT Y BIODIVERSIDAD

Trabajo de investigación presentado por Sergio Valea Peces para optar al grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM)

Vº Bº de la directora

Vº Bº del director

El doctorando

Mª Asunción de los Ríos Murillo

Jacek Wierzechos

Sergio Valea Peces

Madrid, 2015



La Dra. **María Asunción de los Ríos Murillo**, Científico Titular del Museo Nacional de Ciencias Naturales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Dr. **Jacek Wierzchos**, Científico Titular del Museo Nacional de Ciencias Naturales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación desarrollados en la memoria de tesis doctoral **“Ecosistemas microbianos endolíticos en nódulos superficiales de halita del Desierto hiperárido de Atacama: microclima, microhábitat y biodiversidad”**, han sido realizados bajo su supervisión y son aptos para ser presentados por el Ldo. Sergio Valea Peces ante el tribunal que en su día se consigne, para aspirar al Grado de Doctor en Ecología y Medioambiente por la Universidad Complutense de Madrid.

VºBº Directora de Tesis

Dra. María Asunción de los Ríos Murillo

VºBº Director de Tesis

Jacek Wierzchos



**ECOSISTEMAS MICROBIANOS ENDOLÍTICOS
EN NÓDULOS SUPERFICIALES DE HALITA DEL
DESIERTO HIPERÁRIDO DE ATACAMA:
MICROCLIMA, MICROHÁBITAT Y
BIODIVERSIDAD**

TESIS DOCTORAL

Sergio Valea Peces

Madrid, 2015

Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC

Dirigida por:

Dra. María Asunción de los Ríos Murillo

Museo Nacional de Ciencias Naturales -CSIC

Dr. Jacek Wierzchos

Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral JAE-CSIC concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y los proyectos nacionales CGL2010-16004, CGL2007-628754/BOS y CGL2006-04658.

A Elena porque...

...mi brújula apunta hacia tí

Agradecimientos

Puedo imaginar que por la cabeza de miles de doctorandos y doctorandas habrá pasado la misma frase ¡Por fin se acaba la Tesis! Este es otro caso más. Esta noche me veo cerrando una tesis que ha tenido etapas buenas y malas rachas y que ha costado más de la cuenta sacarla adelante. Una tesis al límite en muchos aspectos, sobre todo al final, y que no podría haber sido de otra manera por el tema que trata.

Dejar este apartado para el final ya descargado de tanta tensión y viendo el trabajo realizado tiene un punto reconfortante. A estas alturas soy plenamente consciente de aquella frase que dice “... *a hombros de gigantes*...” y que en este largo proceso hay mucha gente implicada con la que me siento profundamente agradecido.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de Tesis, Asunción de los Ríos y Jacek Wierzchos, la oportunidad de haber podido ser partícipe de un proyecto y una aventura increíble que me ha permitido coquetear con las fronteras de lo conocido, recorrer el Desierto de Atacama y poder realizar estancias en lugares asombrosos. Gracias por vuestro compromiso, vuestro esfuerzo y los sacrificios, sobre todo en esta última fase que ha requerido mucha energía extra por parte de todos. Sé que no ha sido fácil.

Echando la vista atrás creo que este proceso se inició en la Universidad, mucho antes de mi llegada al CSIC, y que no habría podido imaginar sin el apoyo incondicional de dos grandes personas que confiaron y creyeron en mí desde un primer momento y que a día de hoy no están para poder ver cómo ha sido el final, Luis Balaguer y Marga Costa, os quiero y os llevaré siempre en el corazón, todavía no sé lo que visteis en mí pero gracias, mil gracias.

De la etapa en la Universidad me llevo además muchas cosas, por ejemplo cogí mi primer avión y todavía recuerdo a Peri sentado a mi lado diciéndome: *no te preocupes eso es normal*. Peri, no sabes cuantas veces he necesitado estas palabras a lo largo de esta tesis. Estoy muy agradecido de habernos cruzado en el camino. A Chipi (que siempre me ve con buenos ojos) y a Rafa, que ofrecieron guía y consejos. A Nico y a Iñaki, me enseñasteis a trabajar y a bajarme de las nubes, a tomarme algo menos en serio a mí mismo. A Esther Pérez Corona y Esteban Manrique, de entre todas las personas con las que me he cruzado, habéis sido siempre las más realistas y las más honestas. Ambos me habéis ayudado a generar perspectiva y me habéis echado un bote salvavidas cuando lo he necesitado. Gracias. Quiero agradecer también a todas las

personas que guardan un buen recuerdo de mí en la facultad de CC. Biológicas de la UCM y que siempre que paso por allí me hacen sentir como si estuviese en casa y nunca me hubiese ido.

A Carmen Ascaso, la voz de la experiencia, gracias por tus consejos, tus lecciones y la comprensión maternal a lo largo de estos años. Mi primera experiencia con un microscopio electrónico la tuve contigo y la llevaré siempre conmigo.

A Alfonso F. Dávila, por su hospitalidad en NASA Ames y el placer de tu compañía en el Desierto de Atacama. Admiro tu dedicación científica. Me has aportado más de lo que te he devuelto, espero algún día ser recíproco y que no recuerdes mis meteduras de pata.

A Brad Bebout, Angela Detweiler, Nathan Bramall, Alberto Fairén, Esther Uceda y Jhony Zavaleta y familia, por el trabajo desarrollado y la amable acogida en NASA Ames (y alguna noche de fiesta que no voy a olvidar en la vida).

A Kenneth Nealson, por su sabiduría y por abrirme las puertas de su casa y familia en mi estancia en los Ángeles. A Rohit Bhartia, por su paciencia, amabilidad y dedicación. A Daniel Campo y su mujer que me hicieron la vida más fácil en Los Ángeles. A Yuri Gorbin, Greg Wanger, Jeff McLean, Roger Laken y Mark Novotny por todo lo aprendido y los esfuerzos en el Craig Venter Institute de San Diego.

A Benito Gómez Silva y Héctor Olivares, por dejar a mi disposición sus instalaciones de la Universidad de Antofagasta, por su alegre carácter y las charlas amenas sobre lo divino y humano.

A la Prof. M^a Teresa García González, jefa del servicio de Difracción de Rayo X del ICA, y a Miguel Juanco, por sus aportaciones al trabajo de composición químico-mineralógica. Al Prof. Hajnos del IA-PAN de Polonia por los análisis de porosimetría por inyección de mercurio.

A todos con los que he compartido el Desierto: Asun, Jacek, Alfonso, Carmen, Bea, Rafa, Maite, Octavio, Jocelynn, Henry, Petr (Pedro), y en especial a Drina y a Nick, los chilenos con el corazón más grande que conozco. Para mí ha sido una experiencia inolvidable. Al tiro!!

A mis compañeras y compañeros del grupo de investigación. A Bea Cámara, mi alter ego en esta Tesis, empezamos juntos, sufrimos juntos y disfrutamos juntos. Yo me quedo con lo bueno. A Mariela Speranza, caíste del cielo en el momento más oportuno y ayudaste a enderezar el rumbo. A Mariajo, que siempre has mantenido una sonrisa y has generado buen ambiente en el

laboratorio. A Sergio Pérez, eres un gran investigador, gracias por las charlas furtivas. A Miguel Ángel, hemos compartido poco, pero creo que en un momento ambos nos sentimos reflejados como en un espejo. A Fernando Pinto, otro que ya no está y al que la tesis le debe algo. Gracias por las sesiones en el microscopio y las lecciones sobre fotografía. A Sara Paniagua, Teresa Carnota y Charo Santos, por vuestro apoyo técnico con las muestras para microscopía y vuestra alegría. A Virgina Souza-Egipsy por el sobreesfuerzo final y tus cálidas palabras.

A las compañeras y compañeros del antiguo CCMA que convirtieron la vida en el centro en algo amable, gracias por vuestra amistad. A Raúl y Raquel, qué os voy a decir..., simplemente que os quiero. Qué buenos años aquellos de los tres cerditos. A Xavi y Jelena, vaya pareja, me siento honrado de formar parte de vuestras vidas. A Mariana y MJ con las que he llorado muchas penas, hemos reído a carcajadas y hemos salvado al mundo miles de veces con un café y una charla “en la terraza” del labo. A Celia y Ana Lázaro por vuestros ánimos y vuestra energía incombustible. A Josemi, Sara, Clara, Elena G. Elena B, Teresa, Irene, Vanesa, Francesca, Poti, Saioa, Liliana, Ana, Pablo, Mikel, Luis y Elena... por el apoyo, las comidas, las conversaciones y las alegrías compartidas. A todo el personal del antiguo CCMA, que a modo de pildoritas han regalado su experiencia para que los “jóvenes” aprendamos.

A José Serrano, a Rosa y a Esther, que me han cogido el teléfono a cualquier hora y han hecho que los trámites burocráticos no sean tan duros.

A mis padres, que sin su esfuerzo sostenido a lo largo de mucho tiempo para evitar que me distrajesen con la primera mosca que vuela no creo que hubiese llegado a este punto, y a mi familia y mi familia política, que con su apoyo incondicional poco a poco se han solventado los problemas.

Por último, el agradecimiento más importante. Eleni, tu más que nadie has padecido esta tesis que nos ha acompañado mucho tiempo y no habría sido posible sin ti. Tu amor, tu complicidad, tu confianza, tu energía, tu tesón, tu apoyo incondicional, tu comprensión y tu saber hacer me han mantenido en un camino que hubiese abandonado hace tiempo si no hubieses estado a mi lado, si no hubieses sido capaz de volverme a montar cada vez que me rompía y si no hubieses sido la persona que más claro veía este día. La tesis te pertenece al 50% y mi corazón al 100%. Contigo soy mejor persona, soy feliz y espero seguir compartiendo la vida mucho tiempo a tu lado. Hoy empieza otro capítulo de nuestras vidas. Te quiero Elena.

Índice

Resumen	5
Summary	11
Introducción General	17
Importancia de los microorganismos en nuestro planeta.	19
Microorganismos de ambientes extremos. La importancia de su estudio.	20
Agua líquida, la condición sine qua non	23
Zonas áridas del mundo: Los desiertos.	26
Adaptaciones microbianas a ambientes áridos e hiperáridos.	29
Hábitats Líticos y Microorganismos Litobióticos	30
El Desierto de Atacama. El Límite seco para la vida en la Tierra	34
Objetivos y Estructura de la Tesis	37
Antecedentes	45
Geografía Física del Norte de Chile: el Desierto de Atacama	47
Clasificación bioclimática actual del desierto de Atacama	50
El origen de la aridez en Atacama	53
Nieblas en el Norte de Chile: Camanchacas	55
Salares en el Desierto de Atacama	57
Propiedades Higroscópicas de las sales: Delicuescencia	61
Microorganismos Halófilos: Ambientes Hipersalinos	63
Material y métodos	69
Material de estudio y Localizaciones de muestreo	71
Descripción ambiental	77
Composición química y mineralógica	77
Estudio microclimático	77
Estructura porosa de los nódulos de sal.	79
Ambiente lumínico	80

Caracterización de la colonización microbiana mediante técnicas de Microscopía	82
Microscopia Óptica: Estereoscópica, de Campo Claro y Contraste Interferencial.	82
Microscopía de Barrido Láser Confocal (CSLM) y Microscopía de fluorescencia.	83
Microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LT-SEM).	84
Microscopia Electrónica de Transmisión	85
Descripción de la diversidad microbiana	86
Extracción de ADN.	86
Reacción en cadena de la polimerasa. (PCR)	87
Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	87
Aislamiento y secuenciación de las bandas	88
Análisis de secuencias obtenidas por DGGE	89
Estimación de la biomasa microbiana	90
Resultados	91
Estudio microclimático I: Condiciones microclimáticas externas	93
Radiación PAR	93
Precipitaciones	94
Temperatura y Humedad Relativa	95
Temperatura	99
Humedad relativa	100
Composición química y mineralógica	102
Porosidad de los nódulos de sal	102
Estudio microclimático II: Condiciones microclimáticas internas	106
Temperatura	106
Humedad relativa y presencia de agua líquida.	108
Temperatura de punto de rocío	110
Eventos secos y húmedos. Caso Yungay	112
Ambiente lumínico dentro de los nódulos	115
Estudio por Microscopia de la colonización de los nódulos de sal.	118
Microscopía estereoscópica y microscopía óptica de campo claro (MOC).	118

Estudio de la colonización y del microhábitat por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas.	122
Microscopía de Barrido Láser Confocal (CSLM) y de Fluorescencia (MF).	127
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	131
Caracterización de la diversidad microbiana por técnicas de biología molecular.	134
Perfiles de DGGE	134
Afiliaciones taxonómicas	137
Estimación de la biomasa microbiana mediante ATP	142
Discusión	143
Condiciones microclimáticas en el entorno de los nódulos de halita en diferentes áreas de muestreo.	146
Los nódulos de halita como sustrato para la colonización endolítica.	148
Captación de agua por los nódulos de halita.	148
Estructura porosa de los nódulos de halita.	151
Los nódulos de halita como captadores de nutrientes.	152
Ambiente lumínico en el interior de los nódulos de halita	153
Posibles periodos para realizar la fotosíntesis en el interior de los nódulos de halita.	156
Colonización microbiana de los nódulos de halita.	157
Patrones de colonización	157
Diferencias en los valores de biomasa.	158
Cómo se organizan las comunidades microbianas en el interior de los nódulos.	159
Diversidad microbiana de los nódulos de halita.	161
Posible dinámica trófica entre los microorganismos que componen los agregados.	163
Variaciones en la estructura de comunidad en las distintas localizaciones	165
Una comunidad única capaz de vivir a elevadas concentraciones de sal.	169
Implicaciones astrobiológicas	170
Conclusiones	173
Referencias	179
Figuras y Tablas	217
Índice de figuras	219

Índice de tablas	224
Anexos	225
<i>Anexo I: Clasificación de zonas áridas y concepto de aridez</i>	227
<i>Anexo II: Tabla de humedad relativa de equilibrio de diferentes soluciones salinas saturadas</i>	239
<i>Anexo III: Medias diarias mensuales de T/HR (abril 2009 - abril 2011)</i>	243
<i>Anexo IV: Semanas secas en Yungay</i>	249

Resumen

Ecosistemas microbianos endolíticos en nódulos superficiales de halita del desierto hiperárido de Atacama: microclima, microhábitat y biodiversidad.

Introducción.

El desierto de Atacama está considerado como el desierto más seco ($P < 2\text{mm año}^{-1}$) y más antiguo (90-150 Ma) de la Tierra. Su núcleo hiperárido constituye uno de los ambientes más extremos y ha sido considerado como carente de vida. En esta zona, las precipitaciones atmosféricas son tremendamente escasas e irregulares que junto con las elevadas tasas de evaporación ($1300\text{-}1600\text{ mm año}^{-1}$) genera prolongados periodos de desecación. Aparte de la hiperaridez, el desierto de Atacama presenta también otros factores ambientales que imponen severos límites para la vida, tales como una intensa radiación solar que conlleva una elevada dosis de radiación UV, una amplia oscilación diaria de la temperatura y la humedad relativa, condiciones oligotróficas extremas, y con frecuencia elevadas concentraciones de oxidantes inorgánicos y sales en los suelos. En este escenario, como en otros desiertos, los ecosistemas líticos se convierten en los componentes biológicos dominantes. De entre todos los hábitats litobionticos descubiertos formando “islas” u “oasis” a lo largo del desierto de Atacama, cobra especial relevancia la colonización endolítica de los nódulos superficiales de halita que se encuentran presentes en diferentes salares fósiles repartidos por el núcleo hiperárido. Estos nódulos constituyen formaciones exclusivas del desierto de Atacama que permiten el establecimiento de comunidades microbianas basadas en fotosíntesis en áreas previamente descritas como el “*limite seco para la vida fotosintética en la Tierra*”.

Objetivos y metodologías.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal realizar una detallada caracterización de las comunidades endolíticas microbianas presentes en los nódulos superficiales de halita ofreciendo una descripción de su ecología bajo tres aproximaciones metodológicas diferentes pero complementarias que definen los objetivos parciales:

- 1) Caracterizar los elementos abióticos que influyen en la colonización microbiana de los nódulos de halita a través de un análisis comparado de: las condiciones microclimáticas

en el entorno y en el interior de nódulos de halita presentes en distintas localizaciones del núcleo hiperárido del desierto de Atacama, de su composición químico-mineralógica y de su estructura porosa

- 2) Caracterizar el microhábitat y analizar la organización de las comunidades microbianas presentes en el interior de los nódulos, su diversidad morfológica así como las relaciones que mantienen los microorganismos entre sí, a través de distintas técnicas de microscopía.
- 3) Caracterizar la diversidad microbiana en los nódulos de halita mediante un análisis comparado de la estructura de comunidad en distintas localizaciones del desierto de Atacama por DGGE y una estimación de su biomasa a través de técnicas indirectas (ATP).

Resultados

La microclimatología de las áreas de muestreo parece estar sujeta al balance radiativo del suelo, la ausencia de nubes y precipitaciones que explican su regularidad diaria a lo largo del año. Las diferencias registradas a nivel microclimático en el entorno de las halitas permiten agrupar las localizaciones en tres grupos: Yungay la localidad más seca y extrema, que no recibe influencia de masas de aire húmedas oceánicas; Salar Grande Sur, la más húmeda y moderada, que posiblemente se sitúe en un área de transición entre el desierto absoluto y el desierto costero; y las localidades de Llamará y Salar Grande Norte que manifiestan condiciones intermedias.

Los datos registrados en el interior de los nódulos de halita muestran la presencia de agua líquida durante un 66% del tiempo medido (6 meses) en Yungay y un 100% en Salar Grande Sur. Esta presencia de agua líquida en el interior de los nódulos coincide con niveles adecuados de intensidad lumínica para realizar la fotosíntesis. En este sentido, los nódulos exhiben capacidad para filtrar la radiación UV en los primeros milímetros de la roca permitiendo la transmisión de un 11-12% de radiación fotosintéticamente activa a 6-9 mm de profundidad cuando se presenta agua líquida.

La colonización microbiana en el interior de los nódulos de halita se presenta en forma de agregados celulares dispuestos entre los espacios entre los cristales de sal, o adheridos a ellos, embebidos en una salmuera de NaCl y frecuentemente asociados a espacios con aire. Los

agregados celulares se componen de células de un posible nuevo género de cianobacteria, como productor primario, y agrupaciones de bacterias no fotosintéticas y arqueas relacionadas filogenéticamente con organismos de otros ambientes hipersalinos. A esta organización básica se suma la presencia de otro productor primario (alga) en las dos localidades de Salar Grande. Los microorganismos que forman parte de los agregados están estrechamente asociados y embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) dentro de la cual se producen distintas interacciones bióticas y abióticas.

La comparación de la estructura de comunidad microbiana en los nódulos muestra diferencias en la representación de los filotipos mayoritarios entre las distintas localidades cuyo único elemento en común en los perfiles lo constituye la cianobacteria y posiblemente un filotipo potencialmente asignado al género *Salinibacter*. Los representantes del dominio Arquea son los que muestran perfiles con más variaciones entre las áreas estudiadas. Los niveles de biomasa, en torno a 10^5 cels/gr de zona colonizada, son bajos en comparación con otras comunidades microbianas de ambientes extremos.

Discusión y Conclusiones

Aunque en un principio las cuatro áreas estudiadas se encuentran dentro del núcleo hiperárido del desierto de Atacama, que se caracteriza por su estabilidad climática, ha sido posible detectar diferencias a nivel microclimático en el entorno de los nódulos entre localidades. Estas diferencias han podido ser vinculadas a las variaciones en el comportamiento microclimático en el interior de los nódulos, a las diferencias en la estructura porosa, y a las variaciones en la estructura de comunidad microbiana detectadas en el desarrollo de esta tesis. Los factores observados que presentan mayor influencia son el valor de la humedad relativa media, la probabilidad de aparición de eventos en los que los nódulos se secan totalmente, el valor máximo de la temperatura diaria y el valor de la oscilación térmica.

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los nódulos de halita: delicuescencia, microporosidad, morfología y capacidad para filtrar la radiación UV permitiendo el paso de radiación fotosintéticamente activa, desempeñan un papel esencial y activo en la dinámica de este sistema que facilita la colonización del interior de los nódulos por comunidades de

microorganismos basadas en la fotosíntesis. Estas propiedades configuran a los nódulos superficiales de halita como un hábitat potencial para la búsqueda de indicios de vida en Marte.

El reducido número de filotipos obtenidos en los perfiles de DGGE y la falta de similitudes con organismos de los suelos circundantes u otros ecosistemas microbianos presentes en el desierto de Atacama parece indicar que las características hipersalinas del interior de los nódulos, imponen condicionantes limitantes añadidos a la colonización microbiana endolítica, incrementando la presión selectiva del hábitat y haciendo de los nódulos de halita un microecosistema excepcional y altamente especializado compuesto posiblemente por nuevas especies de microorganismos.

Summary

Endolithic microbial ecosystems in superficial halite nodules from the hyperarid Atacama Desert: microclimate, microhabitat and biodiversity.

Introduction

The Atacama Desert is considered the driest ($<2\text{mm year}^{-1}$ rainfall) and the oldest (90-150 My) desert on Earth. Its hyperarid core is one of the most extreme environments and has been considered lifeless. In this area atmospheric precipitations are extremely scarce and irregular which together with high rates of evaporation ($1300\text{-}1600\text{ mm year}^{-1}$) generates long periods of desiccation. Aside from the hyperaridity, Atacama Desert also has other environmental factors that impose severe limits to life, such as elevated UV-radiation levels and intense solar radiation, large daily fluctuations of temperature and relative humidity, extreme oligotrophic conditions, and often elevated concentrations of inorganic oxidants and salts in soils. In this scenario, as in others deserts, lithic ecosystems become the dominant biological components. Among all the lithobiontic habitats discovered forming “islands” or “oasis” across the Atacama Desert, the endolithic colonization of superficial halite nodules that are present in different fossil salt flats scattered in the hyperarid core is particularly relevant. These nodules are unique formations of the Atacama Desert which allow the establishment of microbial communities based on photosynthesis in areas previously described as “*dry limit for photosynthetic life on Earth*”.

Objectives

The main objective of this PhD thesis is to carry out a detailed characterization of endolithic microbial communities in superficial halite nodules providing a description of their ecology under three different but complementary methodological approaches which define the partial objectives:

- 1) Characterization of abiotic elements that influence microbial colonization of halite nodules through a comparative analysis of: microclimatic conditions in the environment and inside halite nodules which are present in different locations in the hyperarid core of the Atacama Desert, its chemical and mineralogical composition and their porous structure.

- 2) Microhabitat characterization and analysis of microbial community organization inside nodules, morphological diversity and relations between microorganisms, using different microscopy techniques.
- 3) Microbial diversity characterization inside halite nodules using a comparative analysis of community structure in different locations of Atacama Desert by DGGE and an estimation of its biomass analysing the amount of ATP.

Results

The microclimatologic behaviour in sampling areas seems to be subject to the radiation balance of bare soil, the absence of clouds and rainfall, which explain their daily regularity throughout the year. The recorded differences at the microclimate level in the vicinity of the halite can cluster locations into three groups: Yungay the driest and most extreme area, which receives no influence from humid ocean air masses; Salar Grande South, the most humid and moderate area, which may be located in a transition area between absolute desert and coastal desert; and the locations of Lllamará and Salar Grande North which exhibit intermediate conditions.

The recorded data inside halite nodules show the presence of liquid water during 66% of the measured time in Yungay and 100% in Salar Grande South. The presence of liquid water inside the nodules coincides with adequate levels of light intensity for photosynthesis. The nodules exhibit ability to filter UV radiation in the first millimeters of the rock allowing transmission of 11-12% of photosynthetically active radiation to 6-9 mm deep when liquid water is present.

Microbial colonization inside halite nodules is disposed as cell aggregates in the spaces between salt crystals, or attached to them, embedded in a concentrated brine and frequently associated to air spaces. The cell aggregates are composed of cells of a possible new genus of cyanobacteria, as a primary producer, and groups of non-photosynthetic bacteria and archaea phylogenetically related to other organisms of hypersaline environments. To this basic organization is added the presence of another primary producer (algae) in the two locations of Salar Grande. The microorganisms that are part of the aggregates are close associated and embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) where various biotic and abiotic interactions occur.

The microbial community structure comparison between nodules exhibits differences in the representativeness of the dominant phylotypes between different locations whose only common element in the profiles is the cyanobacteria and possibly a phylotype potentially assigned to the genus *Salinibacter*. The representatives of the Archaea domain show more variations in profiles between the studied areas. Biomass levels, about 10^5 cells / g of colonized area, are low in comparison to other microbial communities in extreme environments.

Discussion and Conclusions

Although at first the four studied areas are within the hyperarid Atacama Desert core, which is characterized by its climate stability, it has been possible to detect environmental differences at microclimate level of nodules between locations. These differences have been connected to the microclimatic behaviour variations inside nodules, to differences in the porous structure, and changes in microbial community structure detected in the development of this thesis. The observed factors that have higher influence are: the average of relative humidity value, the probability of appearance of events in which the nodules are completely dry, the maximum value of daily temperature and the value of the thermal oscillation.

The physicochemical and structural properties of superficial halite nodules: deliquescence, microporosity, morphology and capacity to filter UV radiation allowing transmission of photosynthetically active radiation, plays a crucial and active role in the dynamics of this system that facilitates colonization inside the nodules by microbial communities based on photosynthesis. These properties set the superficial halite nodules as a potential habitat for the search for evidence of life on Mars.

The low number of phylotypes obtained in DGGE profiles and the lack of similarities with organisms of the surrounding soils or other microbial ecosystems in the Atacama Desert, suggests that hypersaline features inside nodules, impose added limiting conditions to the endolithic microbial colonization, increasing habitat selective pressure and making halite nodules as an exceptional and highly specialized microecosystem possibly composed of new species of microorganisms.

Introducción General

“If I could do it all over again, and relive my vision in the twenty-first century, I would be a microbial ecologist. Ten billion bacteria live in a gram of ordinary soil, a mere pinch held between thumb and forefinger. They represent thousands of species almost none of which are known to science. Into that world I would go with the aid of modern microscopy and molecular analysis. I would cut my way through clonal forests sprawled across grains of sand, travel in an imagined submarine through drops of water proportionately the size of lakes, and track predators and prey in order to discover new life ways and alien food webs. All this, and I need venture no farther than ten paces outside my laboratory building. The jaguars, ants, and orchids would still occupy distant forests in all their splendor, but now they would be joined by an even stranger and vastly more complex living world virtually without end. For one more turn around I would keep alive the little boy of Paradise Beach who found wonder in a scyphozoan jellyfish and a barely glimpsed monster of the deep.”

E.O.Wilson on “The Diversity of Life” in *Naturalist* (1994).

Importancia de los microorganismos en nuestro planeta.

Vivimos en un mundo dominado por los microorganismos. Desde los inicios de la vida en la Tierra, hace unos 3800 millones de años, y durante los siguientes 2000 millones años, los organismos procariotas fueron las únicas formas de vida en nuestro planeta. En todo ese tiempo los microorganismos, gracias a su versatilidad genética y fisiológica, se han adaptado y han amoldado el planeta, colonizando todos los hábitats en los que la vida, tal y como la conocemos, puede existir y conformando la biomasa dominante en nuestra biosfera (Whitmann *et al.*, 1998). En este proceso, los microorganismos han constituido las bases de todos los ecosistemas (*Ecopoiesis*, Haynes, 1990) y desarrollado todas las estrategias metabólicas que conocemos (Leigh, 2002), lo que les confiere a su vez un papel esencial en la regulación de los flujos de materia y energía en el planeta (Falkowski *et al.*, 2008).

A pesar de la importancia de las actividades desarrolladas por los microorganismos para el sostenimiento de la vida en nuestro planeta, nuestro conocimiento acerca de las comunidades microbianas dista mucho de los niveles de detalle alcanzados en los estudios ecológicos de animales y plantas. En las últimas tres décadas, y a causa de la aplicación de técnicas de biología molecular independientes de cultivo, la ecología microbiana ha experimentado cambios revolucionarios que han ampliado nuestra capacidad de análisis acerca de la diversidad, distribución y función de los microorganismos en la naturaleza, siendo actualmente una de las áreas del conocimiento en mayor expansión y desarrollo (Xu, 2006; Prosser *et al.*, 2007; Zimmerman *et al.*, 2014). A su vez, los avances tecnológicos en campos como la microscopía o la miniaturización de sensores están permitiendo a la ecología microbiana analizar el marco completo de la realidad biológica, pudiendo abordar el estudio de los microorganismos en su hábitat natural y a la escala en la que éstos llevan a cabo todas sus actividades. De esta forma, la conjunción de estas técnicas permite desentrañar el ambiente donde viven los microorganismos así como el entramado de interacciones bióticas y abióticas que establecen, que son, desde una perspectiva evolutiva y funcional, los condicionantes que determinan su complejidad y su supervivencia (Stahl & Tiedje, 2002). Los datos obtenidos, y su análisis mediante la aplicación de nuevas técnicas bioinformáticas, están ayudando a generar un nuevo marco ecológico más amplio (Thompson *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2013) en el que establecer nuevas hipótesis que nos ayuden a entender la evolución de la vida y el desarrollo de modelos que ayuden a predecir los efectos de los impactos ambientales en la biogeoquímica del planeta (Allen & Banfield, 2005; Faust & Raes, 2012; Zarraonaindia *et al.*, 2013).

Microorganismos de ambientes extremos. La importancia de su estudio.

Dentro de la ecología microbiana, y muy unida a la moderna concepción de esta ciencia, la vida adaptada a ambientes extremos lleva suscitando desde hace tiempo el interés y el asombro de la comunidad científica. Concebidos en primera instancia y durante mucho tiempo, como ambientes estériles (Pituka *et al.*, 2007), a partir de los trabajos pioneros de Brock (1967) y MacElroy (1974), los hábitats extremos han mostrado estar colonizados por una microbiota especialmente adaptada y en muchos casos dependiente de las condiciones fisicoquímicas del medio para crecer y reproducirse, ampliando nuestra concepción sobre la diversidad de la vida (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Se entiende, desde una perspectiva antropocéntrica, que un ambiente extremo es aquel en el cual uno o varios parámetros fisicoquímicos se encuentran alejados del rango de confort o tolerancia de la bioquímica humana, y se denomina extremófilo a aquellos organismos que crecen y se reproducen óptimamente bajo estas condiciones ambientales (MacElroy, 1974). Desde una perspectiva ecológica, además, estos ambientes se caracterizan por presentar ecosistemas con baja diversidad intrínseca de especies (diversidad α) en los cuales suelen encontrarse ausentes grupos taxonómicos microbianos completos (Brock, 1979). Dentro de la categoría de extremófilos se encuentran organismos pertenecientes a los tres dominios del árbol de la vida, Archaea, Bacteria y Eukarya (de acuerdo con Woese *et al.*, 1990), la mayor parte de ellos microorganismos pertenecientes a los dos dominios procariotas (principalmente Archaea; Fig. 1).

Para caracterizar a los organismos extremófilos, el criterio de más amplia aceptación es realizar la tipología en función del parámetro fisicoquímico dominante en el medio que actúa como condicionante de la bioquímica del organismo (véase tabla 1). A su vez, y con suma frecuencia, los hábitats naturales donde se encuentran estos organismos suelen presentar de forma simultánea valores extremos de varios de estos parámetros, siendo considerados en estos casos como organismos poli-extremófilos. Por otro lado, además, se llegan a catalogar como extremotolerantes a otros organismos que por las características de sus hábitats suponen modos de vida extremos aunque su replicación tiene lugar en condiciones más moderadas, como es el caso de algunos organismos endolíticos (*sensu lato*) o de aquellos organismos que resisten los procesos de esterilización de salas limpias.

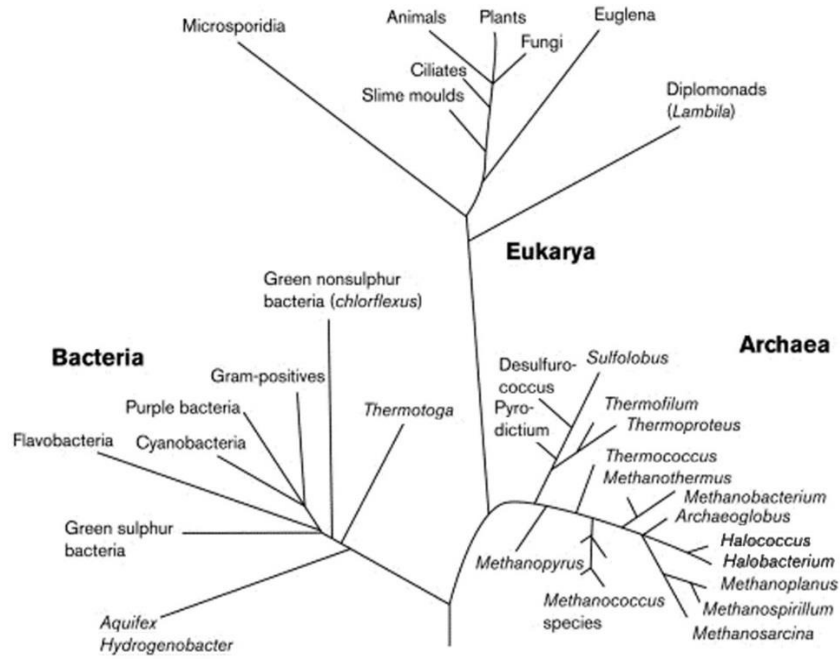


Figura 1: Árbol de la vida: relaciones filogenéticas establecidas a partir de la comparación de la secuencia de los genes que codifican para el ARN ribosómico (modelo de 3 dominios propuesto por Woese *et al.*, 1990).

Tabla 1: Tipología de organismos extremófilos en función del parámetro fisicoquímico dominante y ejemplo de hábitat. Adaptado de Rothschild & Mancinelli, (2001) y Cavicchioli (2002).

Parámetro Fisicoquímico	Tipo	Condiciones ambientales	Ambientes
Temperatura	Hipertermófilo	80-122°C	Fumarolas submarinas, geiseres y fuentes termales
	Termófilo	60-80°C	Suelos, superficies de roca, fuentes termales
	Psicrófilo	-2,5-15 °C	Nieve, hielo, glaciares, fondos oceánicos
Presión	Barófilos / Piezófilos	500-1034 atm	Fondos abisales
Radiación	Radiorresistentes	5-5000 Gy	Suelo, Reactores nucleares
Desecación	Xerófilos / Osmófilos	aw 0,6 - 0,96	Superficies de roca, suelo, medios hipersalinos, petróleo, Desiertos
Salinidad	Halófilos	2-5 M NaCl	Lagos salinos, salinas y lagunas de evaporación, fondos oceánicos, comida en salazón
pH	Acidófilos	pH < 3	Solfataras, residuos de minas, Río Tinto
	Alcalófilos	pH 8-11	Lagos alcalinos
Tensión de Oxígeno	Anaerobios	No toleran la presencia de O ₂	Fumarolas volcánicas, fondos hipersalinos marinos
	Microaerófilos / Capnófilos	O ₂ 2-10% / Elevadas [] CO ₂	Interior estomago animales
Metales Pesados (Ar, Cu, Cd, Zn. ...)	Metalotolerantes/Metalófilos	Altas cantidades de metales pesados en disolución	Residuos tóxicos, minas, lugares industriales
Nutrientes	Oligotrofos	Muy bajas cantidades de nutrientes	Suelos, lagos alpinos y antárticos, zonas pelágicas y oceano profundo

La investigación en ambientes extremos conlleva importantes avances en distintos campos de la biología, algunos de ellos de rápida transferencia a sectores socioeconómicos (Fig. 2). Por un lado, y más allá de la catalogación de nuevos organismos y ecosistemas (diversidad), la peculiaridad fisicoquímica de los hábitats extremos ofrece a la ecología microbiana conjuntos muy definidos de parámetros ambientales que ayudan a comprender aquellos factores que condicionan la distribución de los microorganismos en nuestra biosfera, brindando a la biogeografía microbiana de nuevos ejemplos y nuevas preguntas acerca de los mecanismos de dispersión y colonización microbianos (Atlas, 1984; Torsvik & Øvreås, 2002; Curtis & Sloan, 2004; Martiny *et al.*, 2006). A su vez, la comprensión de las diferentes estrategias fisiológicas y metabólicas utilizadas por los organismos de ambientes extremos ha revolucionado profundamente nuestro conocimiento sobre el papel de los microorganismos en la naturaleza (geomicrobiología) y la aplicación de las enzimas así como de los metabolitos derivados de estos procesos ha desencadenado lo que hoy conocemos como revolución biotecnológica (Herbert, 1992; Dong & Yu, 2007; Kumar *et al.*, 2010).

Por otro lado, y desde un punto de vista evolutivo, los ecosistemas de ambientes extremos nos conectan con la historia geológica de nuestro planeta así como con el origen y episodios tempranos del desarrollo de la vida en la Tierra (Nealson & Conrad, 1999; Rampelotto, 2013), recordándonos que las circunstancias que asumimos como *normales* son un estadio más en una historia plagada de cambios, en algunos casos dramáticos, en las condiciones fisicoquímicas de la superficie terrestre.

En este contexto, los organismos que viven en ambientes extremos y las estrategias que desarrollan para sobrevivir en ambientes fisicoquímicos hostiles han expandido nuestros horizontes sobre *Qué es la Vida* y nuestro conocimiento sobre sus límites fisiológicos, permitiéndonos imaginar, gracias a la plétora de habilidades que desarrollan, que la vida es más robusta de lo que pensamos y que presenta gran capacidad de adaptación. Es por ello que la ecología de los microorganismos de ambientes extremos constituye uno de los pilares de la Astrobiología que intenta, bajo una visión integradora, elaborar hipótesis verificables en torno a la vida más allá de nuestro planeta y entender si los mismos procesos fisicoquímicos y evolutivos que dieron lugar a la vida en la Tierra pueden ser extrapolables a otras partes del Universo (Cavicchioli, 2002; Rothschild, 2007).

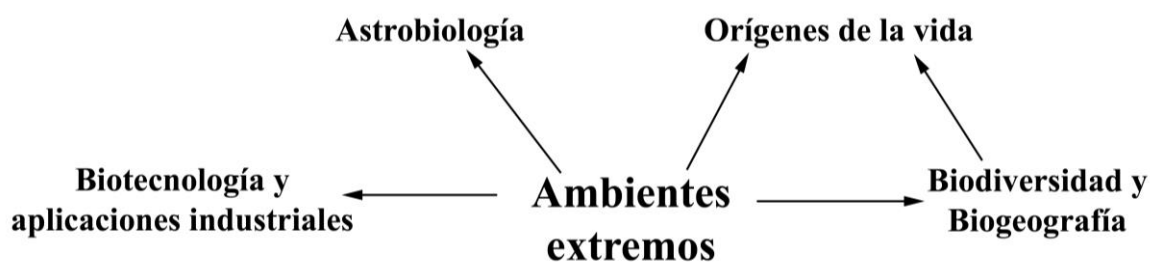


Figura 2: Relación de organismos extremófilos con distintas áreas de investigación y sectores socioeconómicos

Agua líquida, la condición sine qua non

Aunque la vida ha sido capaz de colonizar prácticamente todos los rincones del planeta, esta no es infinitamente adaptativa y tras 4000 m.a. de evolución hay regiones de la Tierra habitables y otras que presentan ciertas limitaciones al establecimiento de organismos vivos (Lineweaver & Chopra, 2012; Preston & Dartnell, 2014). En este contexto, parece haber consenso en torno a que el principal elemento que condiciona la presencia de organismos vivos es la presencia de agua líquida (Hubbard *et al.*, 2002; Jones & Lineweaver, 2010; Lineweaver & Chopra, 2012). En la Tierra, el agua líquida proporciona un escenario fisicoquímico único en el cual tienen lugar las interacciones moleculares que sostienen todos los procesos vitales (Ball, 2004; Mottl *et al.*, 2007). Es por ello que, de entre todos los diferentes ambientes considerados extremos, podría argüirse que es en aquellos donde la disponibilidad de agua líquida se encuentra más condicionada los que imponen mayores límites a la presencia y actividad de los organismos vivos, por lo que su déficit puede ser interpretado como el factor de presión ecológica y evolutiva más importante de todos (ver revisiones de Potts, 1994; Grant, 2004 y Alpert, 2005).

Los determinantes físicos primarios de un hábitat, asociados a la presencia de agua líquida, lo constituyen la temperatura y la actividad de agua. En el caso de la temperatura, y en función de la presión (Fig. 3), queda determinado el estado físico del agua. El rango que los microorganismos pueden soportar es amplio habiendo sido observada la presencia de microorganismos entre los -90°C (Antártida) hasta valores que podría superar los 250°C (en chimeneas hidrotermales de los fondos oceánicos), aunque únicamente se ha detectado división celular entre los +122°C y los -18°C (Takai *et al.*, 2008; Chin *et al.*, 2010) (Fig. 4A). En cambio, la actividad de agua (a_w), que representa la disponibilidad química de agua libre en un sistema, establece límites más estrechos para una biosfera funcional (Fig. 4B). Este parámetro, tomado originariamente de la industria de la alimentación y la industria farmacéutica, deriva de la ley de Raoult que relaciona la presión de

vapor de una solución (p) con la presión de vapor del solvente puro (p_0) cuyo cociente, en una situación ideal, equivaldría a la fracción molar de agua N_w definida como $n_w/(n_w + n_s)$ donde n_w es el número de moles de agua y n_s es el número total de moles de solutos en el sistema. Esta relación también refleja la humedad relativa que se alcanza en el equilibrio (HR_{eq}) cuando se introduce una solución o un producto higroscópico dentro de un contenedor sellado.

$$a_w = p/p_0 = n_w/(n_w + n_s) = HR_{eq}/100$$

De esta forma la a_w del agua pura es igual a 1 ($HR_{eq} = 100\%$) y decrece a medida que se adicionan solutos y sales a la solución que retienen en torno a sus átomos o iones las moléculas de agua (dipolares) no estando disponibles para ninguna otra finalidad. Por ejemplo el agua de mar presenta una a_w de 0.98 y una solución saturada de cloruro sódico (5M NaCl) presenta una a_w de 0.75. La mayoría de los organismos no pueden crecer con a_w menores de 0.9 y muy pocos toleran valores por debajo del 0.85. Por debajo de ese umbral únicamente exhiben crecimiento los halófilos extremos y algunos hongos como *Xeromices bisporus*, que presenta el límite inferior de desarrollo registrado a una a_w de 0.61.

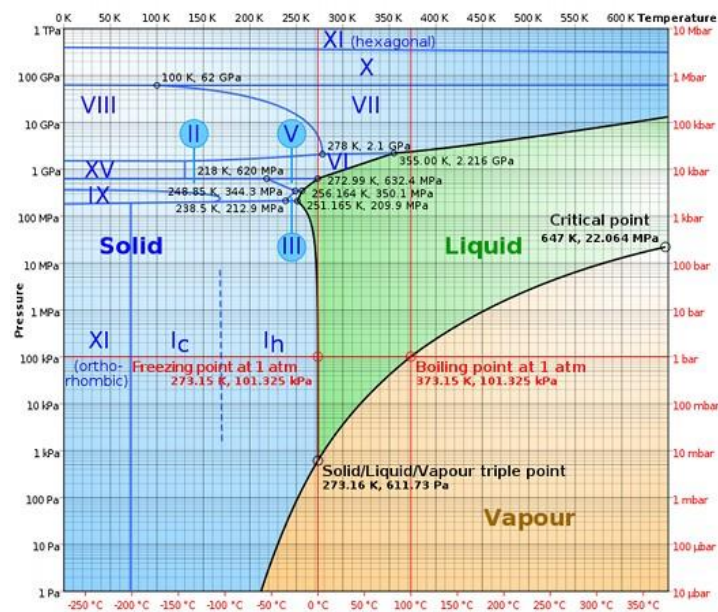


Figura 3: Diagrama de fases del agua en función de la temperatura y la presión. No se incluyen los efectos producidos por la adición de sales en la disminución del punto de fusión y el aumento de punto de ebullición. Los números romanos expresan las 15 diferentes configuraciones estructurales que puede adoptar el hielo. La línea en rojo representa las condiciones terrestres a nivel del mar. Tomada de Wikipedia sin sobreescritura (contribución de Jeremy.rutman)

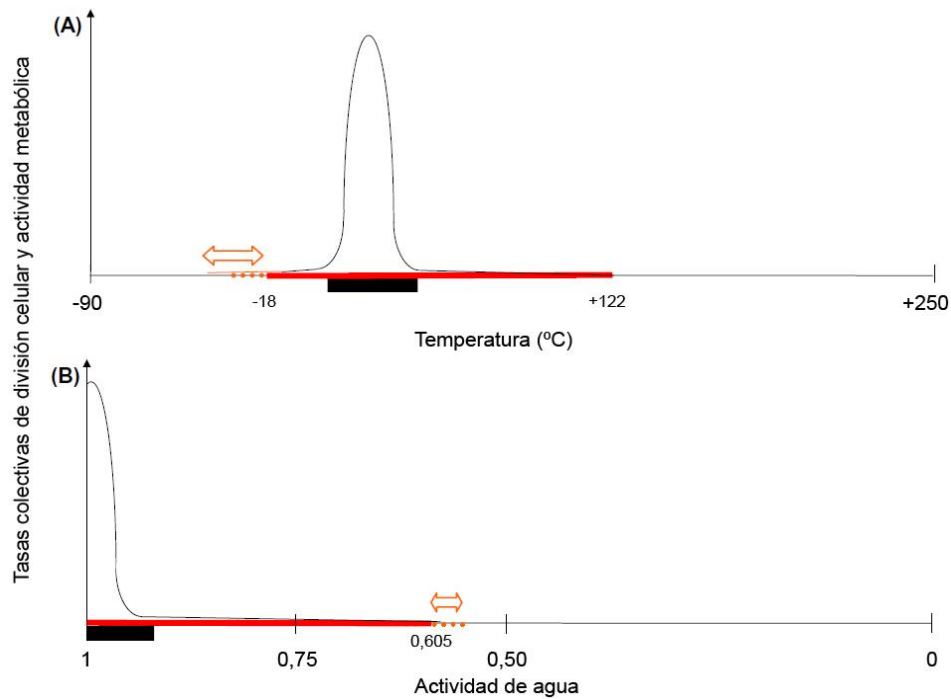


Figura 4: Diagrama de representación de la actividad colectiva (tasas de división celular y actividad metabólica) de los microorganismos en relación a la Temperatura (A) y la Actividad de Agua (B). Las líneas en rojo representan el rango observado en el que se produce división celular. La barra en negro representa el intervalo donde la mayor parte de la actividad microbiana observada en la Tierra tiene lugar. La línea de puntos naranja representa límites teóricos para el metabolismo celular (-33°C) y el límite que se sospecha para la actividad fisiológica del ADN ($a_w < 0.530$). La doble flecha naranja indicaría posibles extensiones en el rango al tener en cuenta escalas de tiempo mayores (decenas o cientos de años, aunque en este sentido hay muy pocos estudios). Modificado de Stevenson *et al.*, 2015.

Otro parámetro asociado a la disponibilidad de agua y que determina el flujo neto de agua en un sistema lo constituye el potencial de agua (Ψ) que representa la suma de los efectos de la presión hidrostática y la actividad química del agua. Este parámetro determina la salida o entrada de agua en las células a través de la membrana semipermeable y se relaciona con la presión de turgor que se debe mantener la célula para el desarrollo de sus actividades. Conceptualmente el potencial de agua puede ser dividido en 4 componentes ($\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p + \Psi_m + \Psi_g$). El potencial osmótico (Ψ_{π}), que representa el efecto de las sustancias disueltas, la presión potencial (Ψ_p) que representa las fuerzas hidrostáticas, el potencial matricial (Ψ_m) que representa la interacción de las moléculas de agua con superficies e interfases y el potencial gravitacional (Ψ_g) que hace referencia a los efectos de las fuerzas gravitatorias. En medios acuáticos el potencial matricial y el gravitatorio pueden ser considerados triviales mientras que en medios terrestres, sobre todo en los suelos, el componente matricial adquiere mucha relevancia.

En las condiciones de la biosfera terrestre, que en función de la temperatura y presión coexisten los tres estados físicos del agua (equilibrio de punto triple), el estrés hídrico ambiental (baja a_w) puede deberse a condiciones de desecación (organismos xerófilos y xerotolerantes), a la presencia de elevadas cantidades de sales o solutos en el hábitat (organismos halófilos, halotolerantes, osmófilos y osmotolerantes) o a bajas temperaturas que induzcan congelación (organismos psicrófilos extremos). Aunque existen diferencias entre los mecanismos de actuación de cada uno de estos procesos y en la compleja respuesta biológica que desarrollan los organismos frente a ellos, en todos los casos se enfrentan en primera instancia a la pérdida de agua líquida del interior de la célula y la consecuente paralización de la actividad metabólica (por el paso del interior celular de estado sol a estado gel en el que el agua deja de ser un solvente continuo), la ruptura de las membranas celulares (debido a cambios estructurales en la bicapa lipídica al perder moléculas de agua), y la desnaturalización de proteínas y ADN (por la desaparición de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas que mantienen la estructura tridimensional funcional) (Nienow, 2009).

En este contexto los desiertos más extremos de la Tierra se contemplan como laboratorios naturales en los que estudiar los límites de la vida en nuestro planeta y constituyen a su vez excelentes análogos ambientales para formular hipótesis acerca del posible establecimiento de vida en otros planetas (Preston & Dartnell, 2014), sobre todo de Marte, que por su proximidad y debido a la evidencia geológica de que en el pasado fluyó agua por su superficie (Carr, 1996; Fairén *et al.*, 2004, 2009; Squyres *et al.*, 2004; Bibring *et al.*, 2006; Mustard *et al.*, 2008) han convertido a este planeta en el principal objetivo de la búsqueda de la vida fuera de la Tierra. A su vez las investigaciones en desiertos podrían ayudar a entender cómo pudo producirse, a lo largo de la historia del planeta, la colonización del medio terrestre (Beraldi-Campesi, 2013).

Zonas áridas del mundo: Los desiertos.

Abarcando casi un tercio de las superficies emergidas (Fig. 5), los desiertos constituyen en conjunto, y después de los océanos, el mayor bioma de nuestro planeta. Bajo la denominación de desierto se incluyen, en un principio, aquellas zonas cálidas y frías cuyo régimen de precipitaciones anuales no supera los 250mm y que se caracterizan por su baja productividad biológica (Odum, 1971).

Debido a variaciones en los parámetros geoclimáticos (tipo de suelo, altitud, geomorfología, radiación, temperatura, humedad), los sistemas desérticos presentan una elevada heterogeneidad y se encuentran muy diversificados. Para mostrar diferencias entre desiertos a nivel global, un criterio ampliamente reconocido consiste en determinar la disponibilidad total de agua de cada sistema a través del concepto de aridez, que establece de forma genérica las categorías de hiperárido, árido y semiárido a la definición inicial de desierto (véase anexo I).

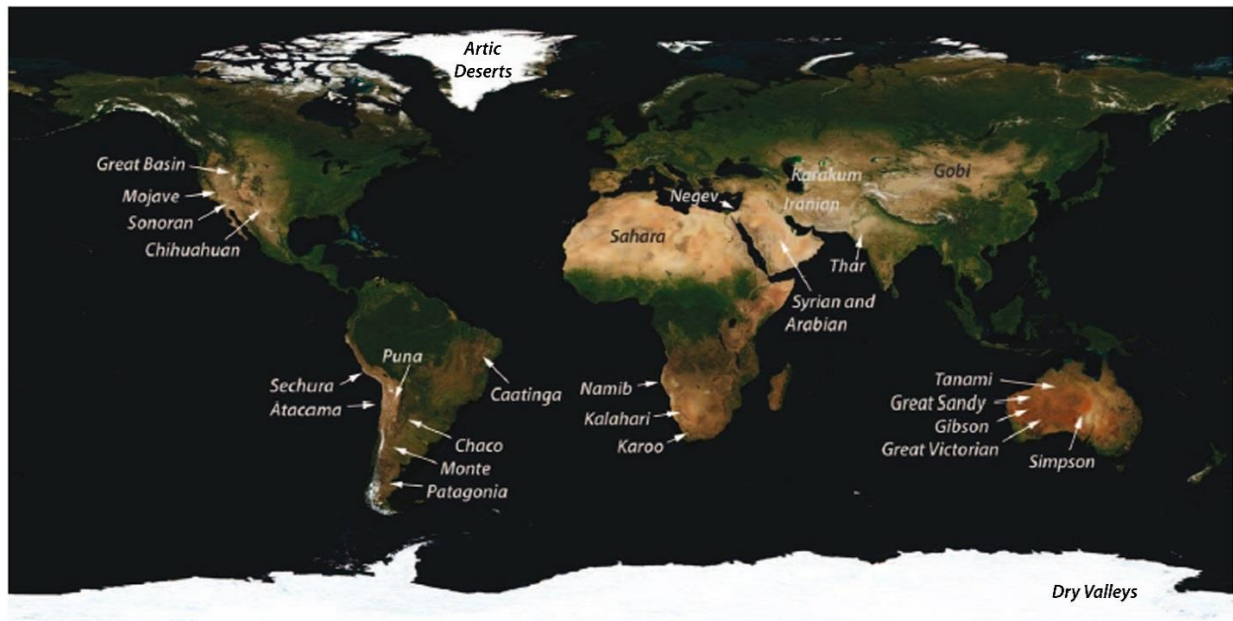


Figura 5. Distribución de los principales desiertos del planeta modificado de Kelt 2011.

Dentro del conjunto de los diferentes desiertos, las regiones hiperáridas (7.5 % de la superficie terrestre) conforman uno de los hábitats más extremos de nuestro planeta. En estas áreas la disponibilidad de agua por precipitación (P) es tremendamente escasa (menor a 10 mm al año) y variable, tanto a lo largo del año como interanualmente, y suelen, además, estar asociadas a elevadas tasas de evapotranspiración (ET) lo cual genera prolongados periodos de desecación, que se traduce en un índice de Aridez ($I.A. = P/ET$) por debajo de 0.05. A su vez, los desiertos presentan con frecuencia otros condicionantes ambientales que limitan el establecimiento de seres vivos, como elevados niveles de radiación solar, valores extremos de temperatura o la práctica ausencia de nutrientes y materia orgánica. Es por ello que, tal como ocurre en otros ambientes extremos, los microorganismos suelen constituir la biomasa dominante e incluso llegan a ser los únicos componentes biológicos del sistema (Bhatnagar & Bhatnagar, 2005; Gorbushina, 2007).

De forma general, las investigaciones sobre la diversidad microbiana en los biomas desérticos se han centrado primordialmente en el estudio de la microbiota presente en los suelos (Cary *et al.*, 2010; Andrew *et al.*, 2012; Crits-Christoph *et al.*, 2013), en la rizosfera de algunas plantas (Aanderud *et al.*, 2008; Collins y Cavigelli, 2003), en sistemas como las costras biológicas (García-Pichel *et al.*, 2001; Belnap *et al.*, 2003; Nagy *et al.*, 2005; Maestre *et al.*, 2011), o en diferentes tipos de comunidades litobióticas (véase revisiones de Nienow 2003; 2009; Omelon, 2008; Wierzchos *et al.*; 2012a; De los Rios *et al.*, 2014a).

Debido al conjunto de adaptaciones que presentan, estas comunidades de microorganismos son altamente sensibles a los cambios del entorno y a medida que la aridez se vuelve más extrema, el tipo de nicho funcional disponible se reduce y su distribución se vuelve más dispersa (Bowker *et al.*, 2010; Pointing & Belnap 2012. Fig. 6). Por ejemplo, las costras biológicas suelen presentarse de forma ubicua en desiertos semiáridos encontrándose prácticamente ausentes en las regiones más áridas, donde cobran mayor relevancia los hábitats hipolíticos y endolíticos que, a modo de refugio, ofrecen protección frente a la intensa radiación solar, las fluctuaciones de la temperatura, el viento y la desecación (Friedmann, 1980; Golubic *et al.*, 1981; Walker & Pace, 2007a; Nienow, 2009; Wierzchos *et al.*; 2012a; De los Rios *et al.*, 2014a; 2014b).

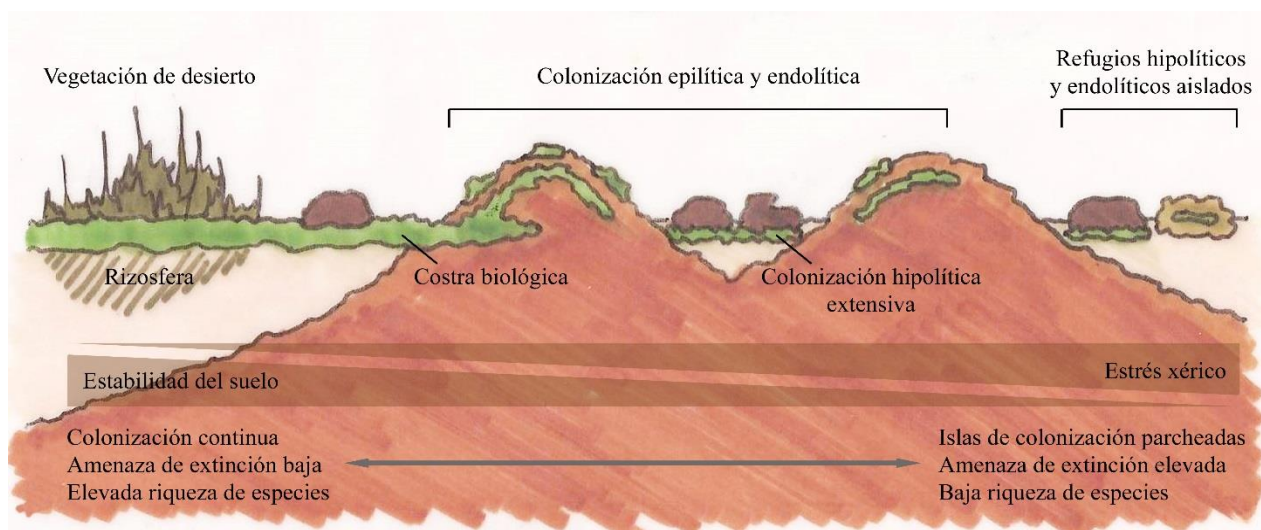


Figura 6: Principales nichos microbianos en zonas áridas. El sombreado verde demarca la colonización y pretende ilustrar la continuidad de la misma en función del gradiente de aridez. Sobre la imagen se muestra a su vez la relación inversa entre el incremento del estrés xérico y la estabilidad del suelo, ligada en última instancia a los patrones de colonización. La riqueza de especies correlaciona negativamente con el incremento de la aridez mientras que la amenaza de extinción aumenta con el incremento del estrés xérico. Modificado de Pointing & Belnap, 2012.

Adaptaciones microbianas a ambientes áridos e hiperáridos.

Bajo una dimensión temporal, el conjunto de factores limitantes que se presentan en los sistemas desérticos lleva actuando de forma continuada durante miles e incluso millones de años generando un estrecho marco ecológico altamente selectivo que favorece la especiación, la aparición de endemismos y la convergencia en la adopción de soluciones adaptativas (e.g. Azua-Bustos *et al.*, 2012). En este sentido, los microorganismos presentes en ecosistemas áridos exhiben distintos tipos de adaptaciones para evitar entrar en parada metabólica (puesto que la maquinaria celular no puede reparar daños en este estado) y reducir el impacto de la falta de agua que pueden ser agrupadas en cuatro grandes grupos en función de las características ambientales (Nienow, 2009):

Por un lado, los organismos presentan adaptaciones para poder prolongar su periodo de actividad más allá de aquellos momentos en los el agua se encuentra disponible, como es el caso de plantas y animales que presentan complejas estructuras multicelulares para el almacenamiento de agua o la reducción de su pérdida. Esta vía de almacenamiento no se presenta en organismos unicelulares que en cambio presentan estructuras extracelulares con la misma finalidad. Por ejemplo, cianobacterias, algas eucarióticas y algunos hongos pueden rodearse de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) con gran capacidad para retener agua, que permiten prolongar el periodo de actividad durante horas e incluso unos pocos días (Potts, 1999; De los Rios *et al.*, 2007; Onofri *et al.*, 2007; Nienow, 2009) A su vez, en costras biológicas y tapetes microbianos los organismos la disposición de esta envuelta de polisacáridos puede retardar la evaporación y facilitar la retención de la humedad del suelo (Mazor *et al.*, 1996; Belnap, 2003; 2006; Nienow, 2009; Mager & Thomas, 2011).

Por otro lado, a pesar de las adaptaciones estructurales comentadas, en los sistemas desérticos los organismos se han de enfrentar al proceso de desecación (Potts, 2001). En algunos casos los organismos recurren a la formación de estructuras de resistencia, como esporas, endoesporas y acinetos (Potts, 1994; 1999). Otros organismos en cambio recurren a adaptaciones fisiológicas, como la síntesis de diversas moléculas orgánicas (polioles, polisacáridos como la trehalosa o aminoácidos como las betainas y ectoinas) denominadas solutos compatibles que ayudan a reducir el potencial de agua de la célula en relación al exterior reduciendo la salida de agua del citoplasma y ayudan a su vez a estabilizar la membrana celular así como la estructura de las proteínas y el ADN (Welsh, 2000; Empadinhas & da Costa, 2008).

Otro conjunto de adaptaciones son resultado de reducir el daño en los sistemas celulares cuando los organismos están sometidos a estrés acuoso, por ejemplo aquellas producidas por la radiación UV. Estas adaptaciones son especialmente notables en organismos fotosintéticos, que de forma general tienen que hacer frente a la acumulación de daños fotooxidativos y cuyos sistemas de recuperación se ven severamente limitados cuando se reduce la cantidad de agua de la célula. En este sentido, la adaptación más simple consiste en la colonización de hábitats que presentan baja intensidad lumínica, como es el caso de hábitats litobióticos (Wynn-Williams & Edwards, 2002; Nienow 2009; Wierzbos *et al.*, 2012a; De los Rios *et al.*, 2014a) donde el flujo fotónico máximo es varios órdenes de magnitud inferior al registrado en superficie (Berner & Evenari, 1978; Matthes *et al.*, 2001, Hall *et al.*, 2008). A su vez los organismos pueden producir diferentes pigmentos fotoprotectores como la escitonemina, melanina, carotenoides, o aminoácidos tipo micosporina (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993; Cockell & Knowland, 1999; Castenholz & Garcia-Pichel, 2002; Sinha & Häder, 2008; Singh *et al.*, 2010; Vitek *et al.*, 2014).

El conjunto final de adaptaciones se asocia con aquellos elementos que permiten a la célula recuperarse del daño asociado a la desecación o al producido en estado desecado cuando las células entran en parada metabólica. En este contexto, los mecanismos más estudiados son los relacionados con el daño en el ADN, como son la presencia en algunos organismos de múltiples copias del genoma, la presencia de genes que sintetizan moléculas para la reparación de los daños en el ADN, o retrasos en la replicación del ADN hasta que el daño se ha reparado (Potts, 1994; 1999; Kish & DiRuggiero, 2012).

Hábitats Líticos y Microorganismos Litobióticos

En sentido amplio, se definen como organismos litobióticos a todos aquellos que colonizan sustratos líticos (Golubic *et al.*, 1981). Las primeras referencias a estos organismos datan de hace casi un siglo (Diels, 1914) aunque sin embargo no fue hasta los años 60 con los trabajos exhaustivos del Prof. E. Imre Friedman y la Dra. Rosali Ocampo-Friedmann en desiertos cálidos y fríos cuando comenzó a profundizarse en este área de estudio (Friedmann & Ocampo, 1976; Friedmann, 1980 y referencias en él; Golubic *et al.*, 1981; Nienow & Friedmann, 1993).

Los organismos litobióticos presentan distribución ubicua a lo largo del planeta habiendo sido descritos, tanto en ambientes acuáticos como terrestres, colonizando diferentes sustratos

líticos como dolomías (Sigler *et al.*, 2003; Cámara *et al.*, 2008; Horath & Bachofen, 2009), areniscas y piedras calizas (Friedmann, 1980; Walker & Pace 2007b; DiRuggiero *et al.*, 2013; De los Ríos *et al.*, 2014a), granitos (De los Ríos *et al.*, 2005; 2007), rocas volcánicas (Herrera *et al.*, 2009; Wierzchos *et al.*, 2013; Cámara *et al.*, 2014), carbonatos (Golubic *et al.*, 1981; De los Ríos *et al.*, 2004), yesos (Hughes & Lawley, 2003; Dong *et al.*, 2007; Wierzchos *et al.*, 2011; 2015), costras y eflorescencias de halita (Rothschild, 1990; Wierzchos *et al.*, 2006; De los Ríos *et al.*, 2010), corales (Magnusson *et al.*, 2007; Kühl *et al.*, 2008; Rubio-Portillo *et al.*, 2014), y pueden encontrarse en biomas tan diferentes como los desiertos o los trópicos, llegando incluso a ser detectados en rocas que se encuentran a casi 3 km de profundidad bajo la superficie terrestre (Chivian *et al.*, 2008).

En función del tipo de microhábitat que colonizan pueden definirse diferentes organismos litobióticos (Golubic *et al.*, 1981; Nienow, 2009; Wierzchos *et al.*, 2012a). De esta forma se designan como *epilíticos*, si los organismos ocupan la superficie de la roca, *hipolíticos* si ocupan la interfase entre la roca y el suelo y *endolíticos* si se encuentran en su interior (Fig. 7). En este último caso, y según Golubic y colaboradores (1981), se pueden hacer distintas subdivisiones en función de su nicho ecológico. Por un lado se denominan *casmoendolíticos* si los organismos colonizan fisuras o fracturas en la roca, manteniendo comunicación con el ambiente externo (habitualmente en rocas silíceas). Si ocupan poros o espacios intersticiales entre los cristales y granos que conforman la roca se denominan *criptoendolíticos* (principalmente en carbonatos y areniscas). Por último se encuentran los organismos que penetran activamente el sustrato, que son los denominados *euendolíticos* (que son comunes en rocas solubles como carbonatos, rocas calcaréas y silíceas en ambientes con agua). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de microorganismo en comunidades endolíticas de yesos en el desierto de Atacama, denominados *hipoendolíticos*, que ocupan cavidades y espacios en áreas basales de la roca, próximas al suelo pero sin contactar con él (Wierzchos *et al.*, 2012a).

El tipo de colonización litobiótica parece encontrarse definida por un lado en función de distintos parámetros climáticos y por otro de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de la roca que determinan su bioreceptividad (capacidad para ser colonizada, Guillitte, 1995; Guillitte & Dreesen, 1995; Nienow *et al.*, 2003). Algunas de estas propiedades son su permeabilidad, la estructura y distribución de la porosidad, la capacidad de retención de agua, su composición mineral y el pH, así como el contenido en nutrientes (Walker & Pace, 2007a; Wierzchos *et al.*, 2012a). Dada la naturaleza oligotrófica del sustrato, la comunidades litobióticas suelen contener

organismos fotosintéticos altamente especializados, cianobacterias y algas liquenizadas o de vida libre, que canalizan los flujos de materia y energía dentro del sistema, facilitando el establecimiento de distintos microorganismos heterótrofos como bacterias no fotosintéticas, arqueas y hongos.

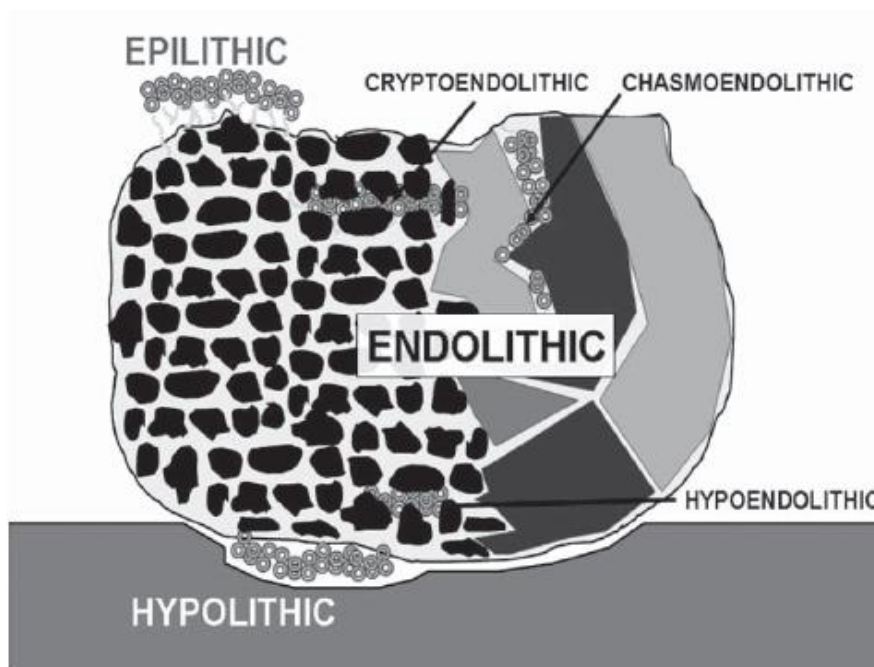


Figura 7: Denominación de los diferentes hábitats litobióticos colonizados por microorganismos. Epilítico (superficie de la roca); hipolítico (parte inferior de la roca en contacto con el suelo); endolítico (principal hábitat en los desiertos extremadamente áridos, y puede ser dividido en criptoendolítico, casmoendolítico e hipoenolítico). Esquema en Wierzechos *et al.* 2012a.

En los desiertos áridos e hiperáridos han sido descritas comunidades epilíticas, hipolíticas y endolíticas, y aunque en algunas zonas áridas llegan a coexistir estos tres tipos de comunidades, a medida que el ambiente se vuelve más extremo la riqueza de especies así como la cantidad y tipo de nichos funcionales se reduce (Pointing & Belnap, 2012. Fig. 6). De este modo, las asociaciones epilíticas, que son las más expuestas a las condiciones ambientales, se vuelven menos frecuentes y diversas quedando reducidas en algunas zonas a lo que se denomina “*barniz de roca*” (Dorn & Oberlander, 1981; Nienow, 2009). Acorde con la disminución o desaparición del nicho epilítico, aumenta la importancia de la colonización hipolítica (Friedmann *et al.*, 1967; Berner & Evenari, 1978; Schlesinger *et al.* 2003; Warren-Rhodes *et al.*, 2006; Pointing *et al.*, 2007; Nienow, 2009; Tracy *et al.*, 2010; Azúa-Bustos *et al.*, 2011; Lacap *et al.*, 2011; Wierzechos *et al.*, 2012a; Stomeo *et al.*, 2013 De los Rios *et al.*, 2014a; 2014b) y endolítica (Wierzechos &

Ascaso, 2001; Ascaso & Wierzchos, 2002; 2003; Nienow 2003; 2009; Selbmann et al., 2005; 2014 Bungartz & Wirth, 2007; Onofri et al.; 2007a; 2007b; Garvie *et al.*, 2008; Cowan *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2012; Wierzchos *et al.*, 2004; 2005; 2006; 2011; 2012a; 2013; 2015; De los Ríos *et al.*, 2003; 2004; 2005; 2005b; 2007; 2014a; 2014b; DiRuggiero *et al.*, 2013; Cámara et al., 2014) que ofrecen protección frente a la radiación solar, una mayor estabilidad física frente a la erosión y los cambios de temperatura, y que permiten aprovechar la escasa humedad disponible en el suelo para realizar la fotosíntesis. En las condiciones más extremas, como el núcleo hiperárido el desierto de Atacama, ciertas regiones del desierto de Negev en Israel o las zonas altas de los Valles Secos en la Antártida, son las comunidades endolíticas las que adquieren mayor relevancia y pudiendo llegar a constituir los únicos refugios seguros para la vida (e.g. contraposición de trabajos de Wharren-Rhodes *et al.*, 2006 vs Wierzchos *et al.*, 2006; 2011; 2013). Los estudios realizados hasta la fecha indican que las comunidades endolíticas presentes en desiertos fríos y cálidos conforman uno de los ecosistemas más selectivos y especializados que se conocen, encontrándose entre los sistemas menos diversos (en torno a 10^2 clados a nivel de especie identificados mediante análisis moleculares, Kemp & Aller, 2004), cuyos componentes parecen proceder de un limitado reservorio (metacomunidad global) de organismos especialmente adaptados, pudiendo ser contemplados como los ecosistemas más simples conocidos. (Walker & Pace, 2007a).

La tendencia manifiesta de los microorganismos a colonizar el interior de rocas en los desiertos más extremos (Wierzchos *et al.*, 2012a; De los Ríos *et al.*, 2014a) ha llevado a numerosos investigadores a considerarlos como verdaderos *oasis* para la vida microbiana y posibles hábitats potenciales para la vida en Marte o al menos como emplazamientos particularmente relevantes para la búsqueda de biomarcadores que evidencien la presencia de organismos vivos (Wierzchos & Ascaso, 2002; McLoughlin *et al.*, 2007; Parnell *et al.*, 2007; Stivaletta & Barbieri, 2008). Del mismo modo, los hábitats endolíticos han sido propuestos además como posibles vehículos de intercambio interplanetario de vida microbiana (panspermia, véase Horneck, 2003).

El Desierto de Atacama. El Límite seco para la vida en la Tierra

Considerado como el desierto más seco y antiguo de la Tierra (Weischet, 1975; Ericksen, 1983; Houston y Hartley, 2003; McKay *et al.*, 2003; Hartley *et al.*, 2005; Houston, 2006; Clarke, 2006), el desierto de Atacama se extiende a lo largo 1200 km entre el Océano Pacífico y la falda oeste de la cordillera central de los Andes (18°S-27°S) abarcando principalmente el norte de Chile y parte de la costa sur de Perú. Su denominado núcleo hiperárido (20°S-25°S) es uno de los lugares más extremos y carentes de vida de nuestro planeta. Aparte de la aridez, el desierto de Atacama presenta otros factores ambientales que imponen severos límites a la dispersión y colonización de los organismos vivos. La acusada oscilación térmica y de los niveles de humedad relativa (Dose *et al.*, 2001) junto con la intensa radiación solar y elevados niveles de radiación ultravioleta (Piacentini *et al.*, 2003; Cockell *et al.*, 2008; Cordero *et al.*, 2014; Wierzchos *et al.*, 2015), actúan de modo sinérgico con la desecación "esterilizando" la superficie y reduciendo la viabilidad de distintas formas de resistencia. Por otro lado, las condiciones oligotróficas extremas así como elevados niveles de oxidantes inorgánicos y sales en los suelos (Navarro-González *et al.*, 2003), condicionan la obtención de energía y nutrientes. El conjunto de estos elementos hacen del desierto de Atacama un ambiente poli-extremo y relativamente inerte, que explicaría la práctica ausencia de organismos fotosintéticos y la escasa abundancia de microorganismos heterótrofos en los suelos (Navarro-González *et al.*, 2003; Drees *et al.*, 2006; Cannon *et al.*, 2007; Neilson *et al.*, 2012). Es por ello, a su vez, que este desierto es considerado como un buen análogo de Marte (Fairén *et al.*, 2010; Preston & Dartnell, 2014) cuyas características actuales se asemejan más a los desiertos hiperáridos terrestres.

A pesar de este escenario, se han encontrado y descrito diferentes nichos líticos que, a modo de oasis, permiten el establecimiento y supervivencia de comunidades de microorganismos a lo largo del desierto de Atacama. En la cordillera de la costa, bajo la influencia del rocío y la niebla marina, denominada localmente *camanchaca*, se han encontrado microorganismos hipolíticos bajo rocas translucidas, principalmente cuarzos (Warren-Rhodes *et al.*, 2006; Azúa-Bustos *et al.*, 2011). Se han descrito también líquenes epilíticos junto con cianobacterias, algas y hongos endolíticos en costras de yesos en áreas con altos niveles de humedad relativa en el aire (Dong *et al.*, 2007; Wierzchos *et al.*, 2011). Por otro lado, en las regiones más secas del desierto, los hábitats que permiten el establecimiento de microorganismos fotosintéticos son el "*rock varnish*" (Kuhlman *et al.*, 2008), el interior de rocas volcánicas -ignimbritas (Wierzchos *et al.*, 2013) y

reolitas (DiRuggiero *et al.*, 2013)-, rocas calcáreas (DiRuggiero *et al.*, 2013), yesos (Wierzchos *et al.*, 2015) y nódulos superficiales de sal (Wierzchos *et al.*, 2006; De los Rios *et al.*, 2010a).

De entre todos estos nichos cobra especial relevancia la colonización endoevaporítica de los nódulos superficiales de sal (Wierzchos *et al.*, 2006, De los Rios *et al.*, 2010; Stivaletta *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2015) presentes en diferentes salares fósiles repartidos por en el núcleo hiperárido del desierto de Atacama. A diferencia del resto de ecosistemas líticos, los nódulos de sal, descritos por primera vez por Wierzchos y colaboradores (2006), no sólo actúan a modo de refugio, sino que además el sustrato, a través de sus propiedades higroscópicas (delicuescencia, Dávila *et al.*, 2008) y estructurales (microporosidad, Wierzchos *et al.*, 2012b), desempeña un papel activo en la captación y retención de agua, permitiendo extraer agua líquida de la humedad del aire facilitando de este modo el establecimiento y supervivencia de las comunidades microbianas en lugares del desierto donde apenas se han registrado precipitaciones en décadas (McKay *et al.*, 2003).

Los datos obtenidos hasta la fecha configuran al desierto de Atacama como uno de los mejores escenarios para desarrollar estudios relacionados con la ecología microbiana de ambientes extremos, y las investigaciones que se están desarrollando en él están proporcionando información importante acerca de las características fundamentales de la Vida en la Tierra y aportando pistas acerca del posible establecimiento de la Vida en otros planetas permitiendo elaborar hipótesis acerca de hábitats potenciales donde la vida pudo haber tenido lugar o incluso poder seguir prosperando.

Objetivos y Estructura de la Tesis

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal realizar una detallada caracterización de las comunidades microbianas presentes en el interior de los nódulos superficiales de sal (NaCl-halita) presentes en distintos salares fósiles situados en el núcleo hiperárido del desierto de Atacama. Asimismo, se lleva a cabo una exhaustiva descripción de la estructura y propiedades físico-químico-mineralógicas del sustrato evaporítico –macroeflorescencias nodulares de halita– que constituyen el último refugio para la vida microbiana en las condiciones de máxima hiperaridez y máxima radiación solar en nuestro planeta. El estudio se ha realizado bajo tres aproximaciones metodológicas diferentes pero complementarias en aras de ofrecer una aproximación ecológica al funcionamiento de esta nueva, y posiblemente única, comunidad endoevaporítica.

En primer lugar, con el fin de entender cómo de “extremos” son los lugares donde se localizan estas comunidades, ofreciendo de este modo datos reales con los cuales poder establecer analogías concretas sobre hábitats potenciales en otros planetas, y describir, a su vez, aquellos factores ambientales que influyen en la colonización y la estructura de las comunidades que componen los nódulos de sal se realizaron dos estudios microclimáticos comparativos. Un primer estudio ha permitido analizar las condiciones microclimáticas externas (temperatura, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa) durante dos años consecutivos en las cuatro localizaciones del desierto de Atacama utilizadas en los análisis de diversidad. El segundo estudio se realizó en las dos localizaciones que más diferían entre sí respecto a las condiciones microclimáticas externas y que analiza las condiciones microclimáticas (temperatura, humedad relativa y radiación solar) que se producen en el interior de los nódulos en la zona de colonización y que facilitan el establecimiento de microorganismos. Este estudio es posiblemente uno de los más exhaustivos realizados hasta la fecha en el interior de un hábitat endolítico. Estos análisis han sido completados con un estudio de la porosidad de la roca y análisis sobre la composición químico-mineralógica de los nódulos.

Por otro lado, se ha realizado una caracterización a través de distintas técnicas de microscopía de la colonización microbiana presente en el interior de los nódulos de sal. Estos análisis han permitido mostrar la forma en que los microorganismos colonizan este sustrato evaporítico en salares de distintas localizaciones, describir el microhábitat e identificar las relaciones que establecen los microorganismos con el sustrato y entre sí.

Por último, la caracterización de las comunidades microbianas realizada por microscopía se ha complementado con un estudio comparado de la diversidad microbiana de nódulos

colonizados procedentes de distintas localizaciones del desierto de Atacama utilizando una técnica de fingerprinting molecular, la DGGE y una estimación de la biomasa total a través de la cuantificación de ATP. Los datos obtenidos han permitido avanzar en el conocimiento sobre qué componentes microbianos dominan estas comunidades y analizar cuáles son las similitudes y diferencias en la estructura de comunidad de cada área de muestreo en relación a los parámetros microclimáticos.

Para ello la tesis se ha organizado en los siguientes capítulos:

- Un capítulo de Antecedentes en el que se introduce una descripción del Norte de Chile y el desierto de Atacama, así como aquellos conceptos y referencias que en opinión del doctorando constituyen una ampliación del marco conceptual establecido en la introducción.
- Un capítulo de Resultados, que incluye todos los datos obtenidos en el desarrollo de esta tesis cuyo orden de aparición intenta seguir la pauta marcada en la descripción de las distintas aproximaciones sobre las que se sustenta la tesis.
- Un capítulo de Discusión, en el que se propone dar una visión global del ecosistema que conforman los nódulos de sal a través del análisis de los distintos resultados obtenidos y de las interrelaciones entre ellos. La discusión se ha establecido agrupando los aspectos que mejor definen las particularidades de este sistema e intentando mantener un punto de vista comparativo, que es donde reside la máxima potencia de este estudio ya que ha permitido,
- Y por último un capítulo donde se establecen las principales conclusiones de esta tesis.

Parte de los resultados obtenidos durante esta Tesis han sido comunicados en distintos congresos nacionales e internacionales y han constituido partes relevantes de artículos publicados en revistas de alto índice de impacto por el grupo de investigación donde se ha realizado la Tesis. A continuación se proporciona un listado de las comunicaciones y artículos científicos en los que ha participado el doctorando:

Valea, S., De Los Rios, A., Ascaso, C., Cámara, B. Dávila, A.F. and Wierzechos, J.
Microscopic Study Of Microbial Communities In Halite Rocks Of The Atacama Desert IBERM

2009 Congreso de la Sociedad Española de Microscopia 15-18 Julio 2009, Segovia (España)

Formato: Comunicación escrita y Poster

Wierzchos, J.; De Los Ríos, A.; Dávila, A. F.; Cámara, B.; **Valea, S.**; Estevé, I.; Solé, A.; Roldán, M.; Rodríguez, R.; Sánchez-Almazo, I. M.; McKay, C. P.; Ascaso, C. Primary producers in extreme arid environment of the Atacama Desert: Where, how and when? 19th Annual VM Goldschmidt Conference. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73(13), A58-A58. June 2009. Davos, Switzerland Formato: Comunicación Oral.

De los Ríos, A., **Valea, S.**, Ascaso, C., Davila, A., Kastovsky, J., McKay, C. P., Gomez-Silva B & Wierzchos, J. (2010). Comparative analysis of the microbial communities inhabiting halite evaporites of the Atacama Desert. *International Microbiology*, 13(2), 78-89.

En este artículo se incluyen los resultados de los muestreos y toma de datos correspondientes a los años 2007 y 2008. En él se realiza una identificación y caracterización ultraestructural de la cianobacteria presente en los nódulos de halita y se aportan los primeros datos en relación a las comunidades de bacterias y arqueas heterótrofas asociadas a esta y la primera referencia a la presencia de un alga en una de las localizaciones incluidas en este estudio.

Davila, A. F., Duport, L. G., Melchiorri, R., Jäichen, J., **Valea, S.**, de Los Rios, A., Fairén, A.G. Möhlmann, D., McKay, C.P., Ascaso, C. & Wierzchos, J. (2010). Hygroscopic salts and the potential for life on Mars. *Astrobiology*, 10(6), 617-628.

En este trabajo se describen las posibles implicaciones de la deliquesencia para la habitabilidad en distintas regiones de la superficie de Marte y su relación con el nicho ecológico que suponen los nódulos de sal.

Vítek, P., Edwards, H. G. M., Jehlička, J., Ascaso, C., De los Ríos, A., **Valea, S.**, Jorge-Villar S. E, Davila A.F., & Wierzchos, J. (2010). Microbial colonization of halite from the hyper-arid Atacama Desert studied by Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1922), 3205-3221.

Este estudio, describe la presencia de moléculas protectoras del daño asociado a la radiación UV y demuestra el potencial de la espectroscopía Raman para la identificación de biomarcadores en los nódulos de sal.

Valea, S., De Los Rios, A., y Wierzchos, J. Microorganismos Heterótrofos Endoevaporíticos presentes en costras de Halita del desierto de Atacama, Chile Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos 02-05 September 2010, Blanes (Spain) Formato: Comunicación Oral

Valea, S., De Los Rios, A., Ascaso, C., García González, M.T. Dávila, A.F. Y Wierzchos, J. Patrones de colonización microbiana en costras de halita del núcleo hiperárido del desierto de Atacama Chile. XXIII Congreso Nacional de Microbiología Sociedad Española de Microbiología. 11-14 July 2011, Salamanca (Spain) Formato: Comunicación escrita y Poster

Wierzchos J, De Los Ríos A, Dávila A.F., **Valea S**, Cámara B, Artieda O & Ascaso C. Life at the Dry Limit: Microbial Colonization of Evaporites in the Atacama Desert. 21th Annual VM Goldschmidt Conference. August 2011. Prague, Czech Republic Formato: Comunicación Oral.

Wierzchos, J. Davila, A.F.; Diruggiero, J.; De los Rios, A.; **Valea, S.** Cámara, B. Artieda, O. Speranza, M. Robinson, C.Souterre, T. Souza-Egipsy, V. Ascaso, C. Archipelago of endolithic microbial life in the hyper arid core of the Atacama Desert 9th International Congress On Extremophiles 10-13 September 2012 Sevilla, Spain Formato: Comunicación Oral.

Robinson, C. K., Wierzchos, J., Black, C., Crits-Christoph, A., Ma, B., Ravel, J., Ascaso, C., Artieda, O., **Valea, S.**, Roldán, M., Gómez-Silva, B., & Diruggiero, J. (2015). Microbial diversity and the presence of algae in halite endolithic communities are correlated to atmospheric moisture in the hyper-arid zone of the Atacama Desert. *Environmental microbiology*. 17: 299–315

Este artículo complementa los resultados de diversidad microbiana expuestos en esta tesis utilizando nuevas técnicas de secuenciación masiva y supone la descripción detallada del alga unicelular en una de las localizaciones incluidas en este estudio.

Wierzchos J, Davila AF, Artieda O, Cámara-Gallego B, de los Ríos A, Nealson KH, **Valea S**, Teresa García-González M, Ascaso C (2013) Ignimbrite as a substrate for endolithic life in the hyper-arid Atacama Desert: Implications for the search for life on Mars. *Icarus*.

Este trabajo, aunque no relacionado directamente con los nódulos de sal contiene resultados de estimación de ATP obtenidos mediante una metodología puesta a punto para esta tesis.

Actualmente se encuentran en preparación varios manuscritos para su publicación en revistas científicas internacionales que se corresponden a distintos resultados que se presentan por primera vez en esta Tesis doctoral.

Antecedentes

Hay un lugar sobre la tierra donde prácticamente no llueve jamás, donde los rayos del sol caen implacables sobre el suelo desnudo, donde la vida parece no haber existido. Sin embargo, este lugar, el más seco del planeta, también esconde los más fascinantes secretos de la naturaleza (Barros, 1983)

Geografía Física del Norte de Chile: el Desierto de Atacama

En términos generales, el norte de Chile se encuentra dominado por zonas desérticas y semidesérticas que ocupan un área total de unos 300.904 km², extendiéndose a lo largo de 1200 km entre el Océano Pacífico y la falda oeste de la cordillera central de los Andes (18°S-27°S) llegando a alcanzar parte de la costa sur de Perú. Las zonas desérticas (precipitaciones inferiores a 10mm anuales) que conforman el desierto de Atacama propiamente dicho constituyen el 61,5% de la superficie y ocupan la mayor parte de las dos grandes divisiones administrativas de extremo norte de Chile, la Región de Tarapacá (I) y la Región de Antofagasta (II) (Fig. 8: división político administrativa). Las zonas semiáridas ($P < 100\text{mm}$ anuales) abarcan las zonas altas de la ladera occidental de los Andes y cobran mayor relevancia hacia el sur donde ocupan la Región de Atacama (III) y la mitad norte de la Región de Coquimbo (IV).

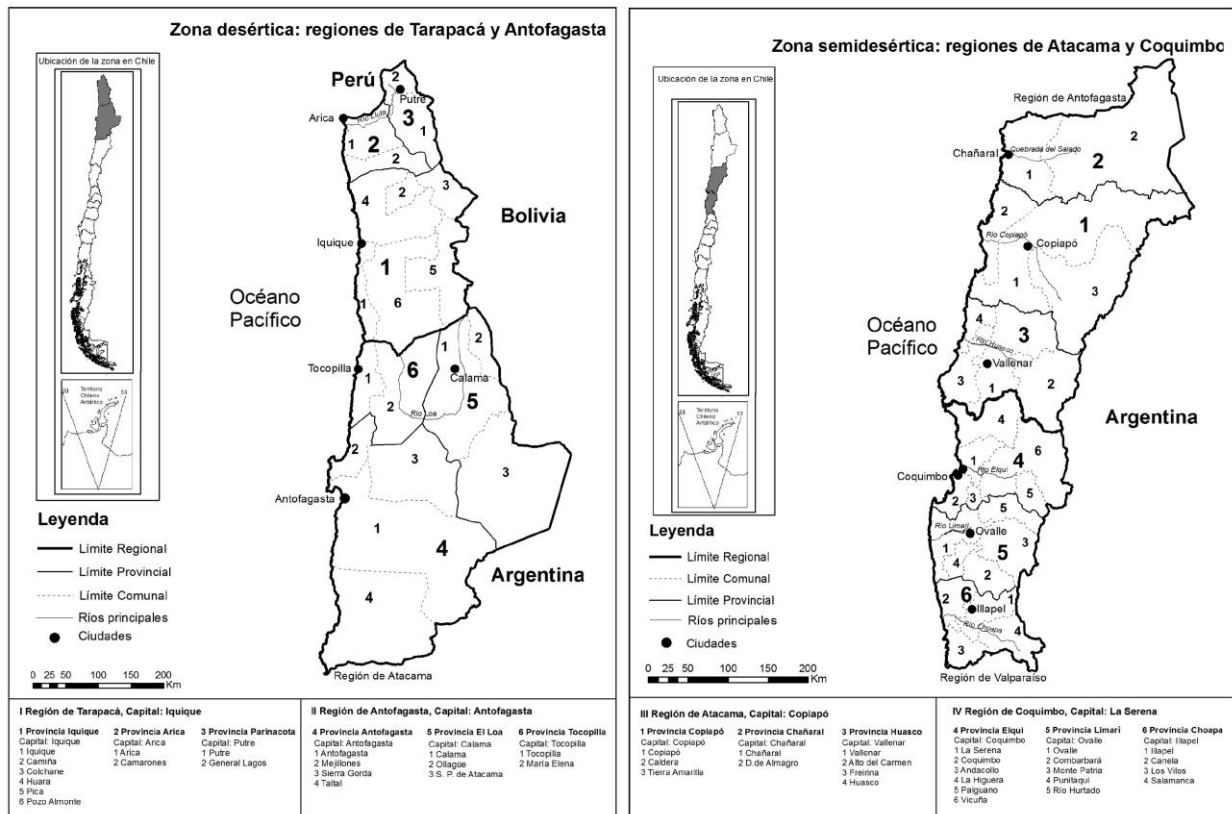


Figura 8: División político-administrativa del norte de Chile. Tomado de Cereceda et al., 2009.

A nivel fisiográfico (Figs. 9 y 10) el Norte de Chile queda definido por la presencia de dos grandes sistemas montañosos que discurren paralelos a la costa, la Cordillera de los Andes al Este y la Cordillera de la Costa al Oeste, y la gran cuenca aluvial que se establece entre ambas, que compone la denominada Depresión o Valle Central. La Cordillera andina (4500-6500 msnm) a su vez incluye un subsistema, la Cordillera Domeyko, que es una compleja sucesión de formaciones

volcánicas y sedimentarias que llegan alcanzar alturas en torno a los 4000 metros considerada como el límite oriental del desierto de Atacama, y entre las latitudes 23°S y 24°S, la cuenca del Salar de Atacama (3000 km²) que supone la mayor anomalía topográfica negativa de la pendiente oeste de la Cordillera de los Andes y que conecta con una meseta altiplánica denominada Puna de Atacama (3400 msnm). Por otro lado, la Cordillera de la Costa (1000-3000m) se alza abruptamente desde el océano formando un gran "farallón" costero y delimitando al oeste una estrecha planicie costera (menos de 500 metros en algunos casos) donde se ubican los principales núcleos urbanos del norte de Chile.

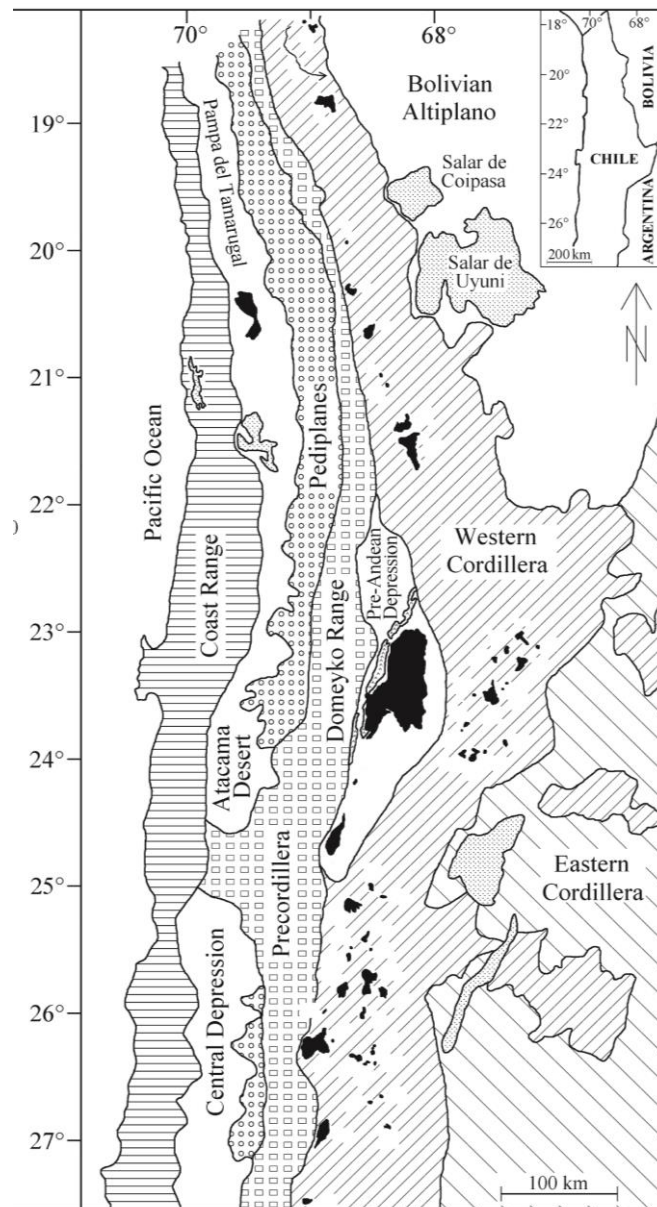


Figura 9: Principales unidades fisiográficas del Norte de Chile. Las manchas negras y grises se corresponden con distintos salares (véase Fig. 17). Adaptado de Risacher et al., 2003.

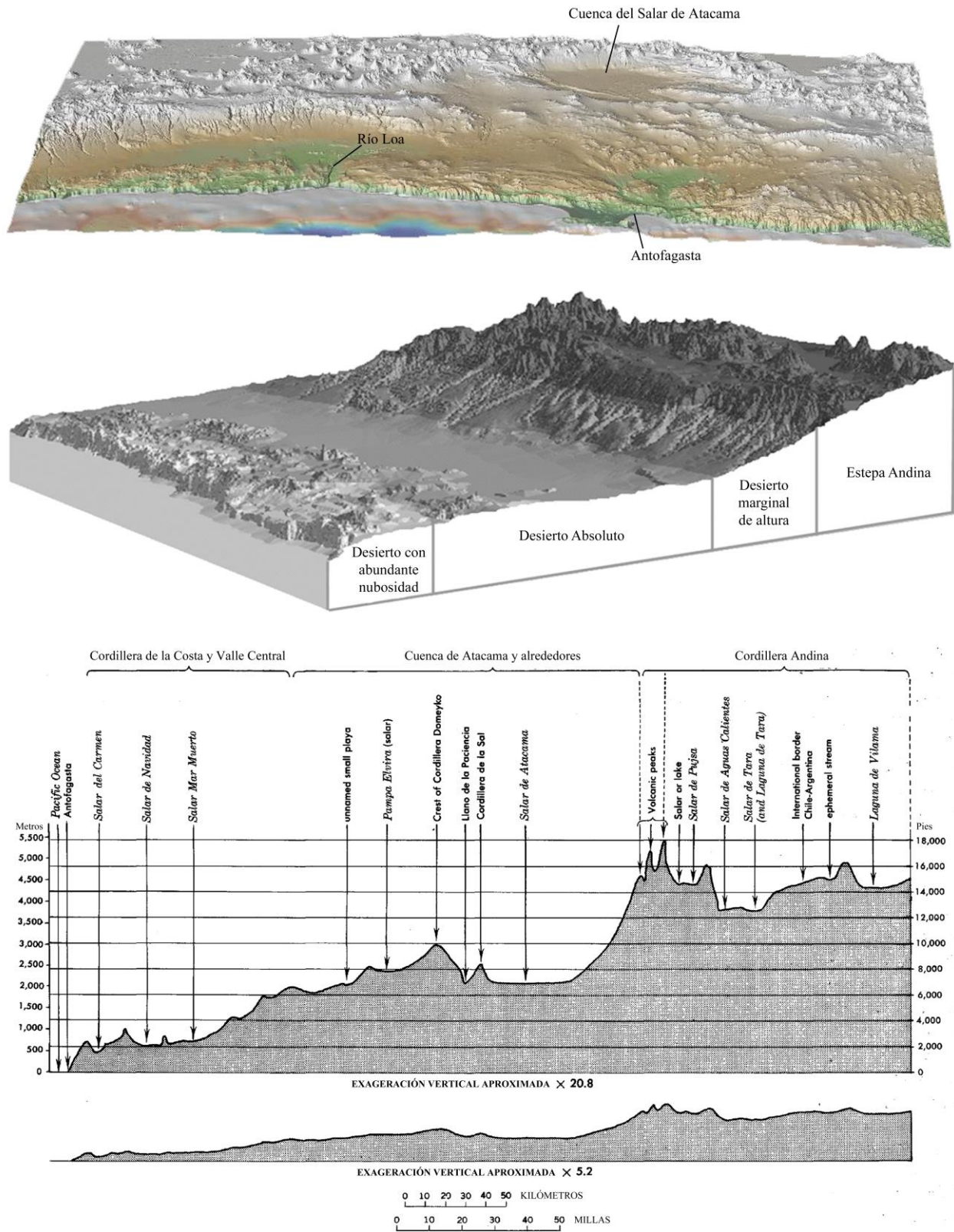


Figura 10: Geomorfología del Norte de Chile. A) Reconstrucción 3d del desierto de Atacama GeomapApp Ryan et al., 2009. B) Vista de perfil, tomado de Cereceda et al., 2008. C) Transecto longitudinal, tomado de Stoertz & Ericksen, 1974.

Clasificación bioclimática actual del desierto de Atacama

En primera instancia para catalogar la aridez actual en el desierto de Atacama (véase anexo I) un buen descriptor lo configuran las isolíneas de precipitaciones (P) así como las calculadas para la evapotranspiración potencial (ETP) en diferentes áreas del desierto (Figs. 11a, 11b, y 11c). En base a estos datos, el Atlas Mundial de la desertificación de la UNEP clasifica de forma uniforme al desierto de Atacama como desierto hiperárido con un índice de aridez (P/ETP) inferior al 0.05 (Middleton y Thomas, 1997). Por otro lado, y sumando a su vez criterios térmicos, en la clasificación de zonas áridas de Meigs se encuentra incluido bajo la denominación Ea23, que lo describe como un desierto templado, con temperatura media anual en torno los 14-16 °C y que presenta una precipitación anual media inferior a 2mm al año, con años en los que no hay registro alguno de precipitación. Si bien estos datos podrían indicar cierta homogeneidad en las condiciones del desierto de Atacama, de acuerdo con la clasificación climática de Köppenn, en el Norte Grande de Chile se pueden diferenciar longitudinalmente dos climas, uno en la planicie costera, donde impera el clima desértico con nublados abundantes (BWn) y otro en la Depresión Central, el desértico normal (BW). Cada uno de ellos presenta diferencias sustanciales en cuanto a temperatura, oscilación térmica y humedad relativa.

A efectos del presente estudio y atendiendo a la peculiar geomorfología de la región, la distribución desigual de las escasas precipitaciones y observaciones de campo, se pueden caracterizar de forma más precisa, y en relación al potencial de actividad biológica, cuatro grandes subdivisiones (Fig. 11d):

Desierto costero, se extiende a lo largo de 3500 km desde la IV región de Chile hacia el norte por la ladera occidental de la cordillera de la costa y las estrechas planicies litorales, desapareciendo brevemente en el extremo norte de la provincia de Tarapacá, y alcanzando el sur de la costa de Perú donde conecta hacia el norte con el desierto de Sechura. Debido a la presencia del gran farallón costero de la costa, el anticiclón del Pacífico y la influencia marina, este área se encuentra sujeta a una inversión térmica casi permanente que favorece la formación y acumulación de nieblas costeras denominada de forma genérica en Chile como *Camanchacas* (ver más adelante). Aunque en esta zona el registro de precipitaciones es prácticamente nulo, se caracteriza por la presencia de nublados abundantes y una elevada humedad relativa que rara vez desciende por debajo del 50%. Los veranos son calurosos con una media en torno a los 25 °C y los inviernos templados con temperaturas cercanas a los 14 °C.

Desierto absoluto, abarca la falda este de la cordillera de la costa y los terrenos de la Depresión Central entre los 600-1800 msnm. En esta zona las precipitaciones son prácticamente nulas, inferiores a 1 mm anual con años en los que ni siquiera hay registros. Eliminadas las áreas de transición esta región contiene el denominado núcleo hiperárido ($IA = [0.0005-0.001]$). Se caracteriza por la intensa radiación solar debido a la ausencia de nubes y una climatología fuertemente dominada por el balance radiativo del suelo presentando fuertes contrastes térmicos día-noche. Los únicos aportes significativos de agua en la zona son las nieblas costeras que consiguen penetrar desde la costa a través de pasillos o corredores que se abren en la cordillera de la costa, y la escasa humedad del aire, que en ciertas áreas de esta región puede llegar a descender del 5%. Las temperaturas medias durante los meses de invierno se sitúan alrededor de los 15-16 °C mientras que durante los meses de verano ascienden en torno a los 20 °C. En un principio, todas las áreas de estudio utilizadas en esta tesis se ubican en esta región del desierto.

Desierto andino o desierto marginal de altura ($IA \sim 0.02$). Se extiende por las laderas occidentales de la cordillera de los Andes en el Norte de Chile abarcando los terrenos comprendidos entre los 1800 y 3500 msnm y conectando con una altiplanicie desértica denominada Puna de Atacama (3400-4500msnm) donde alcanza su máxima extensión. Caracterizado por el frío, los fuertes vientos y la intensa radiación solar, presenta irregulares precipitaciones a lo largo del año que no llegan a superar los 100 mm anuales y que comúnmente tienen lugar en forma de nieve o granizo. Debido a la sequedad y a su carácter continental, la amplitud térmica diaria así como la estacional son acusadas, de forma que en los meses de verano se pueden alcanzar entre los 22 y 35 °C durante el día cayendo a valores entre 3 y -10 °C durante la noche.

Desierto florido, se extiende por el valle interior desde el norte de La Serena hasta el valle del río Copiapó (IV y III región) y constituye el límite meridional del desierto de Atacama. Enmarcado dentro de las zonas semiáridas, se caracteriza por la presencia de precipitaciones periódicas y estacionales entre septiembre-octubre y toma su nombre del fenómeno de floración repentina de plantas efímeras que tiene lugar cuando las condiciones de humedad lo permiten. Esta zona del desierto se encuentra más vinculada a los cambios del fenómeno del Niño- La Niña.

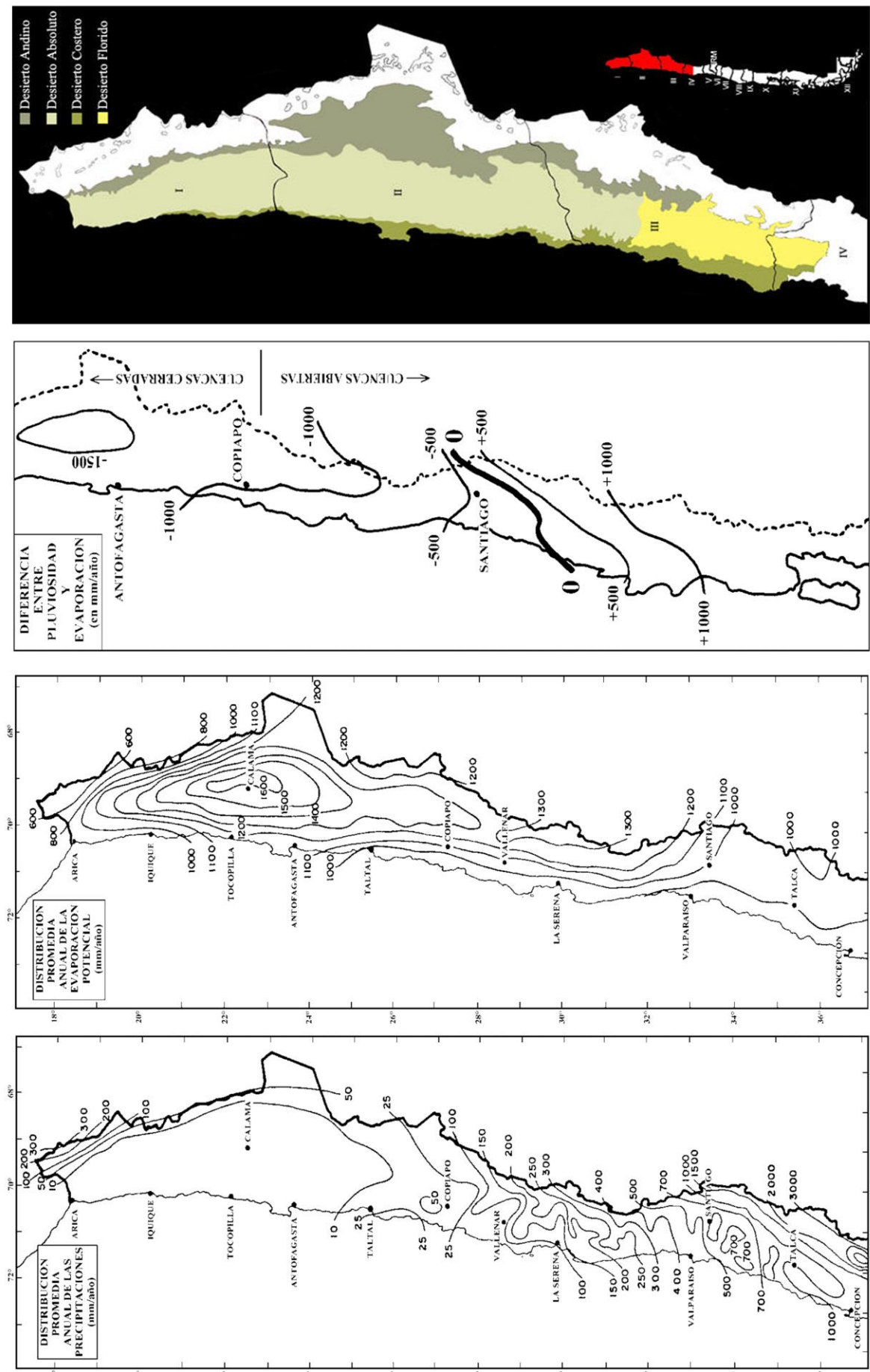


Figura 11: De izquierda a derecha. a) Mapa de distribución anual de precipitaciones. b) Mapa de evaporación potencial. c) Mapa de la diferencia entre pluviosidad y evaporación. d) Principales subdivisiones bioclimáticas del Desierto de Atacama.

El origen de la aridez en Atacama

La extrema aridez del desierto de Atacama debe ser entendida como una combinación entre la falta de precipitaciones y el elevado potencial de evapotranspiración y debe su origen a la confluencia de los efectos de tres grandes factores:

-Un efecto zonal, como consecuencia de la presencia estable del cinturón de altas presiones subtropical que se genera en ambos hemisferios a 30° de latitud debido al descenso de aire caliente y seco proveniente de la célula de Hadley, y cuyas consecuencias, en última instancia, son el desplazamiento de las tormentas hacia el este, la inhibición de la formación de nubes, por la reducción de la capacidad convectiva, y por ende de las precipitaciones. El anticiclón del pacífico sur se mantiene activo todo el año frente a la costa del norte de Chile, aunque es algo más activo durante el invierno es prácticamente estable en cuanto a su posición estacional (Fig. 12a)

-Un efecto oceánico (Fig. 12b), debido al afloramiento frente a las costas de Chile de la corriente de Humboldt, que transporta agua fría hacia el norte a lo largo de la costa chilena y que enfría la masa de aire atmosférico adyacente reduciendo la evaporación de agua de marina, así como el ascenso de las masas de aire, evitando la aparición de precipitaciones y contribuyendo a la estabilidad del aire, generando una inversión térmica permanente que impide la formación de nubes altas productoras de lluvias (Miller, 1976; Rundel *et al.*, 1991; Houston & Hartley, 2003; Houston, 2006). Este efecto junto el anterior genera una inversión térmica constante por debajo de los 800-1000 m de altura (Houston y Hartley 2003).

-Efecto geomorfológico (Fig. 12c), como resultado de la elevada altitud media del área por la que se extiende el desierto, en torno a los 1000msnm, situándolo por encima de la zona de inversión térmica y el efecto de sombra de lluvia que generan desde el este la Cordillera de los Andes y desde el oeste la Cordillera de la Costa. La geomorfología del Norte de Chile constituye el principal factor que lo diferencia de otros desiertos zonales como por ejemplo el desierto del Namib (Namibia), que por latitud pudiera presentar características similares.

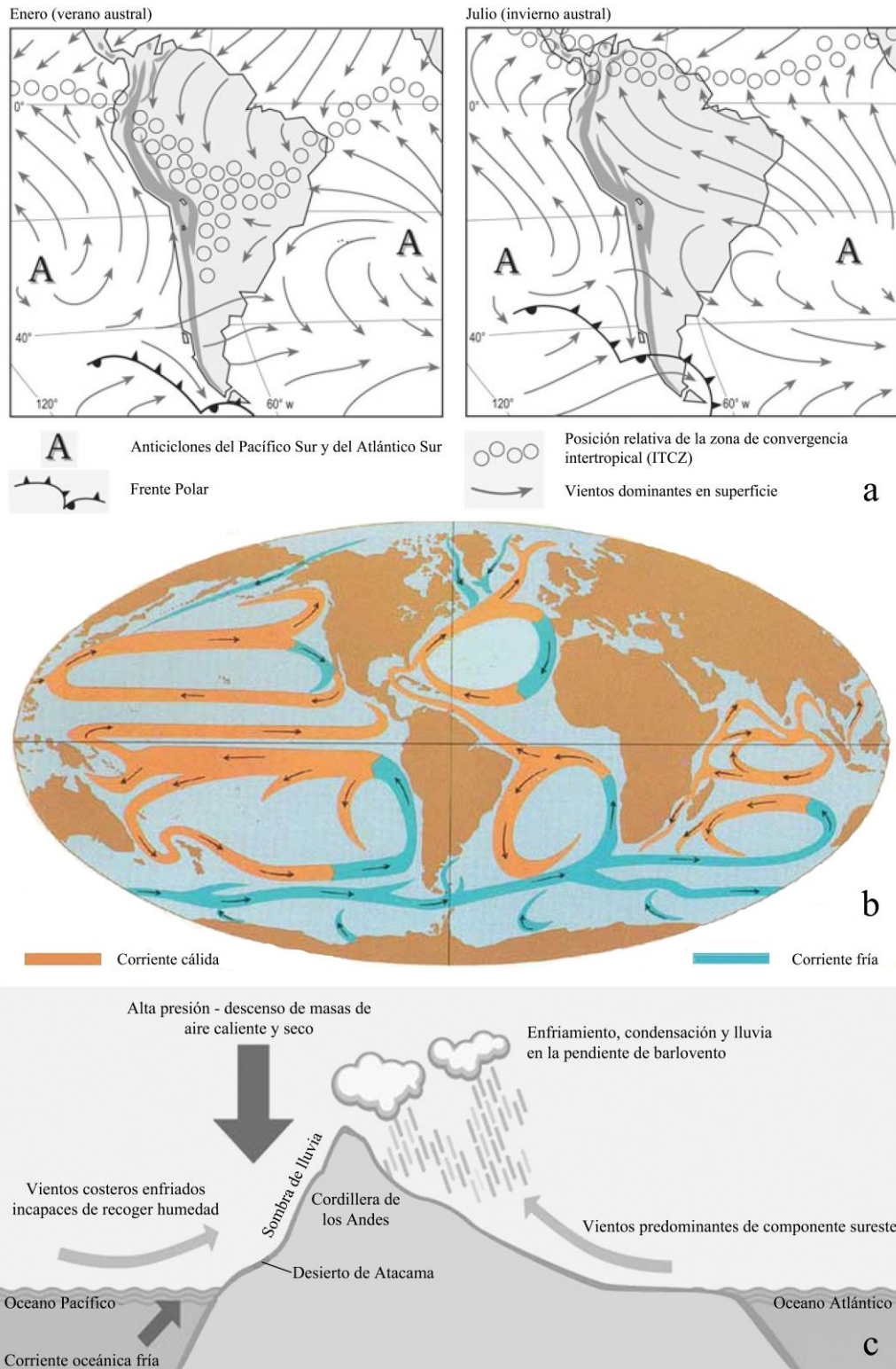


Figura 12: a) Circulación atmosférica sobre América del Sur: Nótese el desplazamiento N-S de la zona de convergencia intertropical (ITCZ) Tomado de Moreira-Muñoz (2011). b) Mapa de distribución global de las corrientes oceánicas frías y cálidas. Compárese con mapa de distribución de los principales desierto del planeta Fig. 5. c) Detalle de la corriente de Humboldt frente a la costa de Chile y efecto de la sombra de lluvia.

La evidencia paleomagnética así como los registros geológicos y mineralógicos parecen sugerir que los inicios de la aridez en la región tuvieron lugar hace unos 150-90 millones de años, con el establecimiento de su posición respecto al ecuador bajo la influencia del cinturón seco de clima subtropical (Fig. 13), y que las actuales condiciones hiper-xéricas no han variado considerablemente durante los últimos 10 -15 millones de años (Houston y Hartley, 2003; Rech *et al.*, 2010).

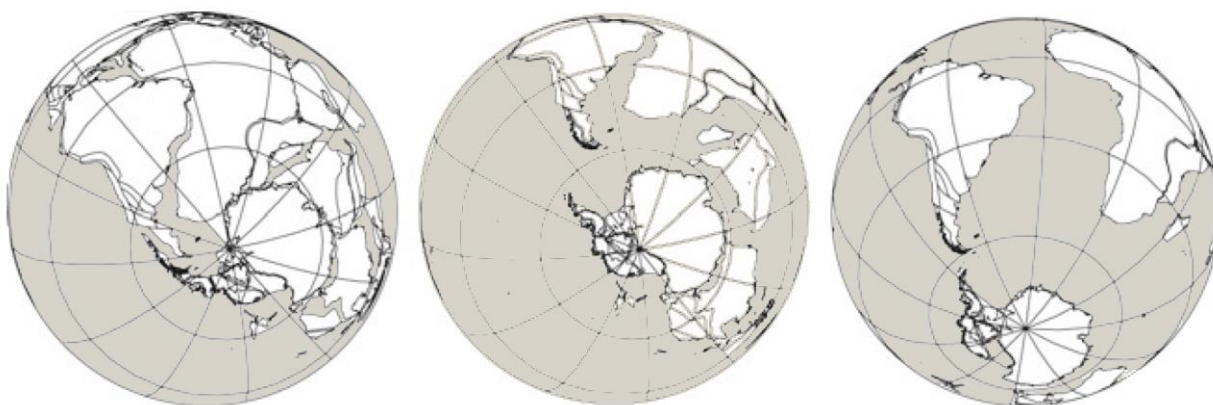


Figura 13: Posiciones de América del Sur durante el Carbonífero tardío (300 ma), inicios del periodo Cretácico (120 ma) y durante el Eoceno (50 ma). Tomado de Moreira-Muñoz (2011).

Nieblas en el Norte de Chile: Camanchacas

A pesar de la falta de precipitaciones algunas localizaciones del desierto de Atacama reciben agua procedente de nieblas, consideradas en el norte de Chile como un importante recurso hídrico, que aporta humedad suficiente para el mantenimiento de algunos ecosistemas como la Pampa del Tamarugal, el crecimiento de algas hipolíticas, líquenes y cactus en zonas próximas a la costa e incluso para el consumo humano (Rundel *et al.*, 1991; Cereceda *et al.*, 2002; Warren-Rhodes *et al.*, 2006). De forma general, y mediante colectores especiales, los aportes de agua procedentes de las nieblas llegan a suponer en torno a una media anual de unos $8,5 \text{ l m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ de agua en las zonas costeras (pudiendo llegar a ser recogidos hasta unos $40 \text{ l m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) y unos $1,1 \text{ l m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ en las regiones situadas a unos 12 km tierra adentro (Cereceda *et al.*, 2002). Los tipos de niebla más frecuentes en el Norte de Chile son de dos tipos: las nieblas de radiación y las de advención.

Las nieblas de radiación, las más habituales, se producen por contacto de una masa de aire cálido y húmedo con una superficie con menor temperatura. Estas nieblas se presentan de forma frecuente en las regiones de la Depresión Intermedia por efecto de enfriamiento nocturno del

suelo por radiación, debido a los cielos permanentemente despejados y cuando las masas de aire se encuentran en calma. Dada la escasa humedad atmosférica registrada en esta región del desierto representan en el balance total un aporte de agua muy bajo.

Por otro lado, y como se ha mencionado anteriormente, en la región costera por efecto del anticiclón del Pacífico y la corriente fría de Humboldt se forma una fuerte zona de subsidencia y una la inversión térmica persistente a lo largo de la costa entre los 500 y 1100 metros que no permite la evolución normal de la nubosidad tropical y produce la acumulación casi permanente de nubes tipo estrato o estratocúmulo (Fig. 14). Cuando la capa de estratocúmulos y la masa de aire frío por debajo de ella son empujadas por los vientos alisios hacia la costa e interceptadas por el relieve se producen densas nieblas de advención denominadas en Chile como “*Camanchacas*” (*Garua* en Perú). Dado su carácter dinámico, las camanchacas son empujadas constantemente hacia la costa donde quedan bloqueadas por la presencia la cordillera de la costa y la inversión térmica, produciendo lo que se denomina oasis de niebla (Rech *et al.*, 2003) penetrando únicamente hacia el interior en aquellas zonas donde la altura de la cordillera es similar a la de la inversión térmica o por discontinuidades orográficas conocidos como corredores de nieblas. Estas nieblas se producen casi a diario durante los meses de invierno y casi la mitad de los días del periodo de verano. En ocasiones asociado al mismo proceso y también en la región costera, por efecto del relieve de la Cordillera de la Costa pueden llegar a producirse nieblas orográficas por enfriamiento adiabático de las masas de aire.

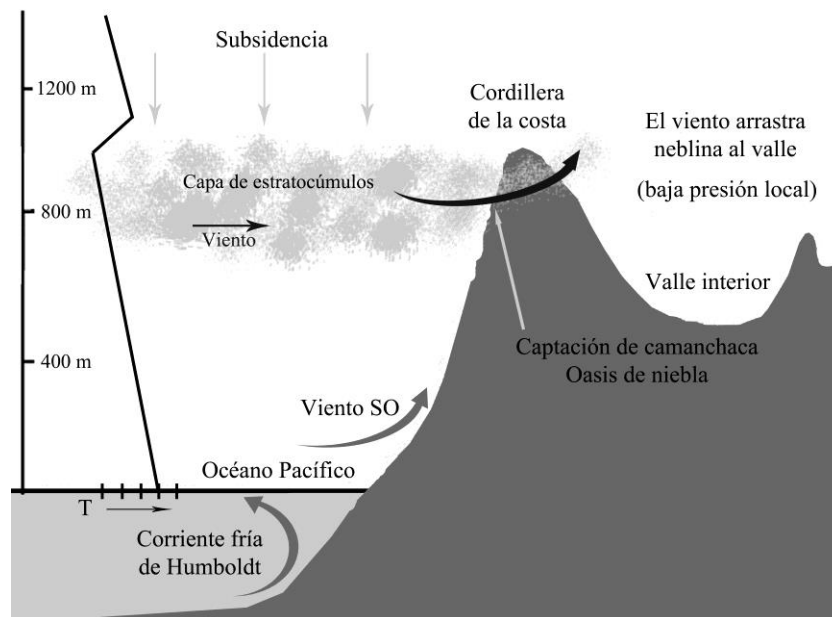


Figura 14: Perfil esquemático del comportamiento de la masa de aire frente a la costa de Chile. Adaptado de Schultz *et al.*, (2012).

Salares en el Desierto de Atacama

La geomorfología del Norte de Chile (Fig. 15 y 16) ha generado cuencas cerradas internas que junto con la escasa pluviosidad y la elevada evapotranspiración favorece la formación de salares, lagos y humedales salinos así como, en los casos más secos, salinas y grandes extensiones de costras de sal seca y suelos salinos (*clay Playas, salt pan, salt flat*) (Stoertz & Ericksen, 1974). A lo largo del desierto se han catalogado más de 100 cuencas de drenaje internas y casi todas ellas se consideran de carácter salino cuya extensión en conjunto cubre un área de casi unos 100000 km².

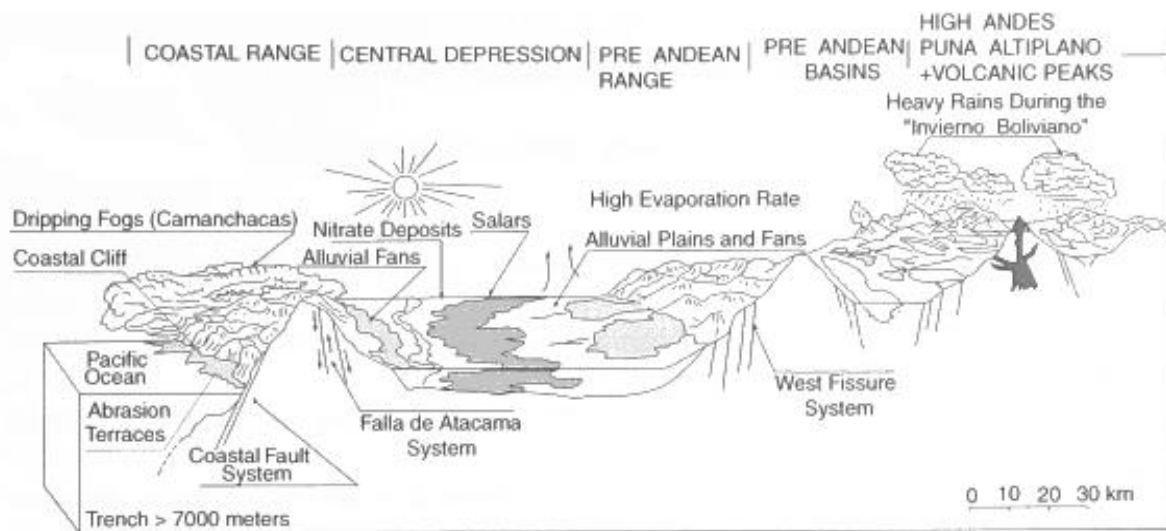


Figura 15: Perfil geológico idealizado con las principales unidades geomorfológicas del Norte Grande de Chile (adaptado de Ortlieb, 1995).

En función de la climatología y la geomorfología del área donde se encuentran las cuencas se pueden realizar tres grandes subdivisiones a la hora de caracterizar los salares (Stoertz & Ericksen, 1974. Fig. 10 y 17). Por un lado se encuentran los salares de la meseta andina (4200 msnm de altitud media), que en su mayoría son activos y reciben aportes de agua de su cuenca de drenaje concentrando las sales por evaporación en lagunas superficiales donde, alcanzados los niveles de saturación en disolución, precipitan las diferentes sales evaporíticas (ciclo típico de salinas efímeras descrito por Lowenstein y Hardie, 1985). Por otro lado, los salares pertenecientes a la cuenca de Atacama y alrededores, cuyo referente es el Salar de Atacama, que se sitúan en el escarpe occidental de la cordillera de los Andes a una altitud media de 2600 metros y que también recibe aportes de agua de su cuenca de drenaje. Y por último, se encuentran los salares de la Cordillera de la Costa y del Valle Central, que son todos prácticamente inactivos, sin

aportes de agua salvo excepcionales eventos de lluvia que pueden ocurrir tras décadas de extrema sequedad, siendo considerados como salares fósiles. Estos salares, descritos por primera vez por Darwin (Darwin 1876, p302), se caracterizan por presentar costra salina superficial muy dura y rugosa cuya profundidad puede variar entre decenas a más de cien metros, como es el caso de Salar Grande. Esta costra suele estar compuesta mayoritariamente por cloruro sódico y cantidades menores de otras sales (en ocasiones en torno a estos salares se produce la acumulación de grandes depósitos de nitratos), mezclada a su vez con sedimentos de arcillas y arenas procedentes de aluviones ocasionales y por deposición eólica que otorgan a las sales un aspecto marrón parduzco. Los salares incluidos en el presente estudio, pertenecen a esta última categoría.

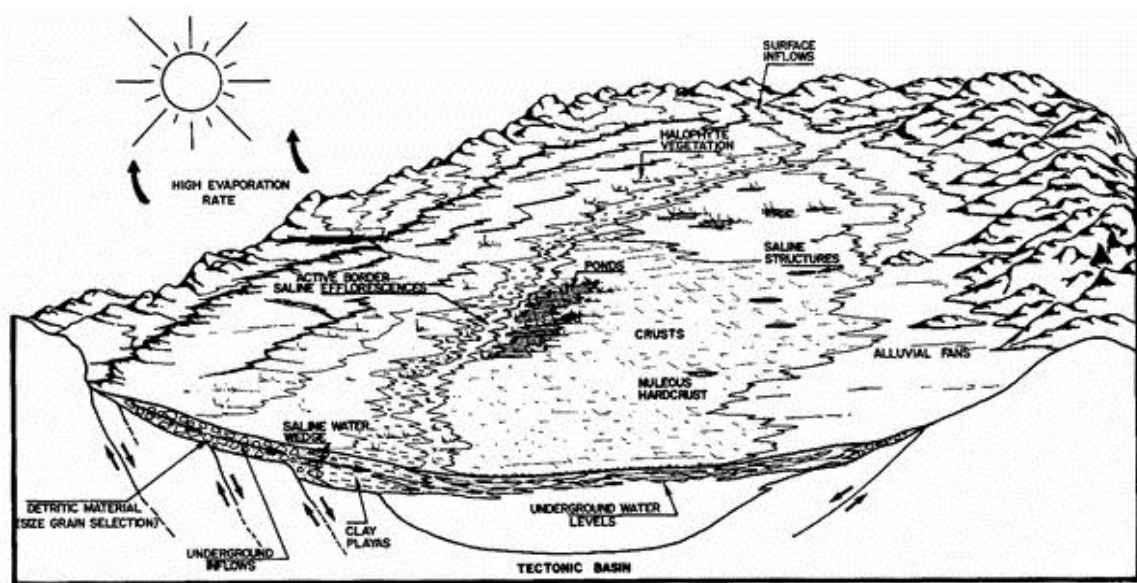


Figura 16: Modelo esquemático de un salar que muestran los factores tectónicos, sedimentarios, hidrológicos, climáticos y biológicos implicados en la formación de salares. Tomado de Chong Díaz, 1988.

En este contexto, la región de Atacama exhibe una gran variedad de morfologías superficiales en los salares generalmente no encontradas en otros desiertos, donde cabe distinguir seis tipos generales de costras superficiales (Stoertz & Ericksen, 1974):

(1) *Rocas masivas de sal bandeadas con una superficie rugosa.* Son formaciones excepcionalmente gruesas y rugosas conformadas por bandas gruesas de sal alternadas con bandas finas de sal limosa mostrando su carácter perenne durante su formación. Este tipo de costra es más común en los salares de la falda oeste de los Andes cuyo ejemplo más representativo es el Salar de Atacama.

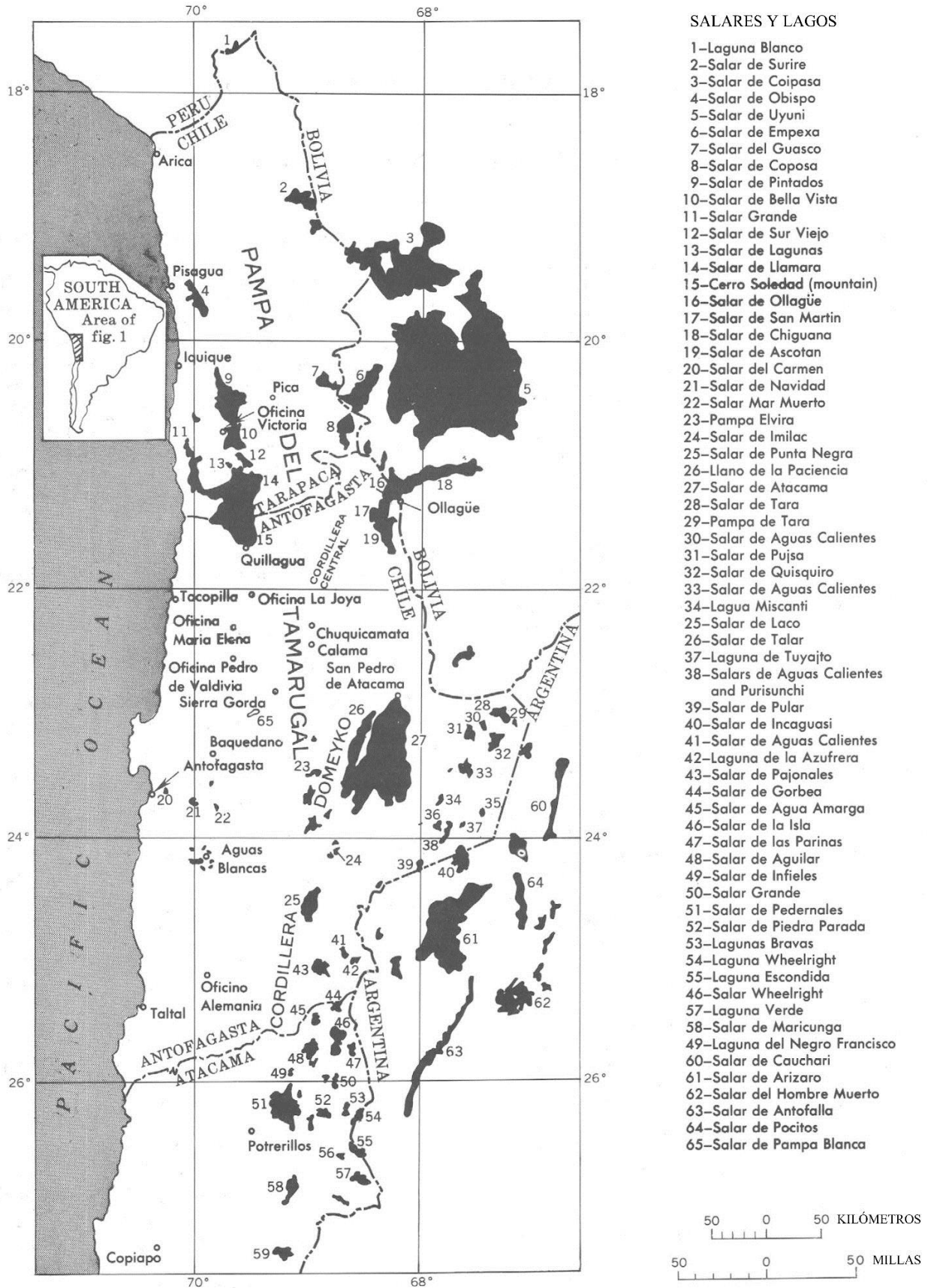


Figura 17: Mapa de distribución de los principales salares y lagos salinos del Norte de Chile. Tomado de Stoertz & Ericksen, 1974.

(2) *Rocas de sal limosa pavimentada y nodular*, muy comunes en la cordillera de la costa y la Depresión Central, se forman por evaporación capilar de la humedad del subsuelo que deposita sales en superficie donde cementan con sedimentos clásticos (25% del total). La costra consiste en fragmentos cementados parcialmente en forma irregular o poligonal que muestran síntomas de compresión y deformación exhibiendo en muchos casos polígonos marcadamente cóncavos. La expansión y contracción térmica diaria contribuyen a su vez a la fracturación de la costra. Los nódulos, que se presentan regularmente en los bordes de los polígonos, se atribuyen como consecuencia de sucesivos episodios de hidratación y recristalización de las sales por efecto de las nieblas (los salares incluidos en este estudio se corresponderían con esta tipología y recientemente se ha publicado una revisión exhaustiva que describe la morfología superficial de estos salares y los procesos implicado en Artieda *et al.*, 2015)

(3) *Costras de yeso o anhidrita de aspecto tosco y áspero*. Presentes sólo en cinco o seis salares, estas costras varían ampliamente de morfología y muestran las diferentes condiciones de aridez del desierto de Atacama, donde en las áreas más secas de la región costera se componen de anhidrita (Salar de Lllamará) y mayoritariamente de yeso en los salares de los Andes (Salar de Surire).

(4) *Roca cristalina de sal tosca y masiva*. Solo presente en Salar Grande, conforma la parte más superficial de un gran depósito de halita casi pura (99%) que puede llegar a alcanzar los 100 metros de profundidad. La costra se asemeja mucho al tipo (2) con la sal mezclada con sedimentos clásticos y mostrando nódulos en superficie. Incluida en este estudio.

(5) *Rocas de sal lisas*. Estas costras son extensos depósitos blancos de sal “fresca” producidos como consecuencia de surgencias o inundaciones de agua más o menos periódicas que quedan atrapadas en fangos arcillosos subsuperficiales que inhiben el drenaje hacia el subsuelo. Al inicio la costra es plana y a medida que se seca forma polígonos que con el tiempo muestran síntomas de erosión, crestas de presión así como los efectos de contracción y expansión térmica, pudiendo asemejarse morfológicamente con estadios iniciales del tipo (2). En Atacama el ejemplo más característico (y a la vez el más húmedo) lo constituye el Salar de Uyuni aunque aparecen también al norte del Salar de Maricunga, al oeste del Salar de Pedernales, y al sur del Salar del Carmen. En este último caso, debido a las nieblas y los largos periodos sin surgencias de agua pueden aparecer nódulos.

(6) *Rocas de sal limosa sobre un lecho de nitratos*. Este tipo de costra se presenta en salares únicos del desierto de Atacama que contienen entre el 10 y el 25% de nitrato de sodio y su superficie se asemeja a la costra del tipo (2) aunque menos rugosa. Se generan por deposición de agua subterránea que se filtra a través de los depósitos de nitratos del subsuelo y suelen encontrarse en las laderas de las montes que rodean los salares. Costras de este tipo se han encontrado en Salar de Lagunas, Pampa Blanca y Salar del Carmen. Explotados intensamente por su carácter comercial, se ha observado que algunos casos (cuando la lámina de agua está próxima a la superficie) si se detiene la actividad minera, la costra de nitratos puede regenerarse en periodos de entre 5 y 10 años.

Si bien la determinación exacta del momento en que se completó la formación de los salares es compleja, en el caso del área de la costa y el Valle Central el material sedimentario que define la cuenca ha sido datado de la Era terciaria desde el pleistoceno hasta el holoceno.

Propiedades Higroscópicas de las sales: Delicuescencia

Una de las propiedades fisicoquímicas de las sales es su capacidad para atraer agua en estado líquido o de vapor de su ambiente circundante (higroscopía). En función de cada compuesto el agua atraída puede ser retenida mediante interacciones de carácter físico con el material, quedar atrapada en su estructura cristalina o mantenerse adsorbida en su superficie. En los dos últimos casos la retención del agua suele ser de carácter reversible estableciéndose para cada caso una humedad de equilibrio que refleja el valor de la humedad atmosférica en la cual el material capta humedad a la misma velocidad que libera agua. De este modo, si la humedad atmosférica es menor que la humedad de equilibrio el material se seca cediendo agua a la atmosfera y si es superior se hidrata. Casi todas las sales solubles son higroscópicas y absorben cantidades elevadas de agua llegando formar una disolución líquida. En este caso se denominan delicuescentes y la humedad de equilibrio puede ser referida como humedad de delicuescencia (Anexo II).

El proceso de delicuescencia, usando como modelo el NaCl, presenta varias etapas cuyo esquema se muestra en la figura 18. Al inicio, cuando la humedad relativa del ambiente se encuentra por debajo de la humedad relativa de equilibrio el agua interacciona con el sólido (cristal) a través del mecanismo de adsorción (pasos 1 al 3). Normalmente los sólidos cristalinos adsorben unas pocas capas moleculares de agua, 2-3 capas en el caso del NaCl, y no se observa

disolución (Foster & Erwing, 2000). A medida que se incrementa la humedad relativa más vapor de agua se adsorbe en la superficie formando una película saturada cuando se alcanza la humedad relativa de equilibrio, que puede llegar a disolver por completo el cristal si la humedad del ambiente se mantiene por encima de este umbral (pasos 4 al 6). El proceso inverso se denomina eflorescencia y supone cristalización de la solución y la expulsión del agua del sistema. Una solución saturada de NaCl (5M) comienza a cristalizar espontáneamente por debajo del 45% de humedad relativa ambiental.

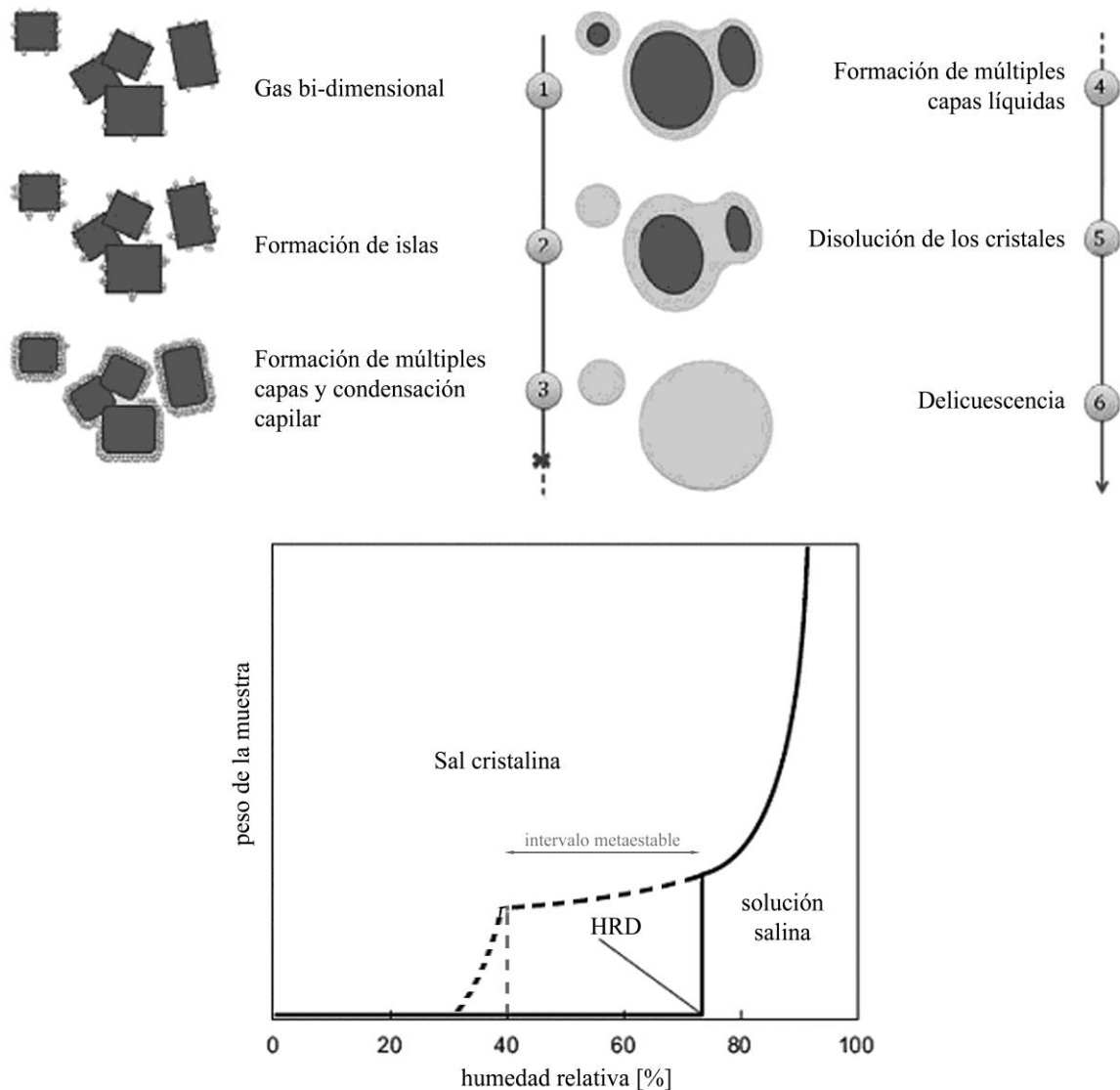


Figura 18: a) Esquema del proceso de delicuescencia de NaCl. Adsorción, condensación y disolución de agua sobre cristales higroscópicos. Tomado de Langlet et al., 2011. b) Curva de cambio de peso de una muestra de NaCl durante el incremento de humedad relativa línea continua. Humedad de equilibrio de NaCl 75% a 25 °C. La línea discontinua muestra el proceso estimado de eflorescencia. Humedad de cristalización de una solución 5M de NaCl 45% Modificado de Franzen & Mirwald 2009.

Microorganismos Halófilos: Ambientes Hipersalinos

En la Tierra, la vida es capaz de desarrollarse dentro de un amplio rango de concentraciones salinas, desde el agua dulce hasta lugares donde la salinidad puede alcanzar valores de saturación, y aunque las sales constituyen una necesidad básica para la vida, no todos los organismos responden de la misma manera a los distintos grados de salinidad, pudiendo ser considerada como uno de los principales factores que regulan los patrones globales de distribución y diversidad de microorganismos (Martiny *et al.*, 2006; Lozupone & Knight, 2007; Auguet *et al.*, 2010).

Aquellos organismos que requieren para su supervivencia concentraciones superiores a la del agua de mar (3.3% de sales totales disueltas), se los denomina de forma genérica halófilos. Más concretamente, Kushner y Kamekura (1988) propusieron una clasificación en función de la respuesta de desarrollo y crecimiento de los organismos a las diferentes concentraciones de sal donde se pueden distinguir de tres grandes conjuntos: los **no-halófilos**, que solo son capaces de crecer y desarrollarse a las concentraciones salinas por debajo de la que presenta el agua de mar (e.g *E.coli*); los **halotolerantes**, capaces de tolerar altas concentraciones de sal pero cuyo óptimo fisiológico tiene lugar a concentraciones menores de 0,2 M; y los **halófilos obligados**, que son aquellos que necesitan elevadas cantidades de sal para crecer y desarrollarse. Dentro de este último conjunto se clasifican a su vez tres subgrupos en base a su respuesta a la concentración de cloruro sódico (NaCl): a) Halófilos leves, cuyo crecimiento óptimo tiene lugar entre el 2-5% de NaCl (0.2-0.85 M); b) Halófilos moderados, cuyo óptimo de crecimiento se sitúa en torno al 5-20% de NaCl (0.85-3.4 M); y c) Halófilos extremos, cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre el 20-30% de NaCl (3.4-5.1 M) (Kushner y Kamekura, 1988).

De entre todos los ambientes salinos, aquellos en los que la salinidad es más elevada o se encuentra cercana a valores de saturación son los imponen mayores constricciones para la vida. Estos ambientes, denominados hipersalinos, están ampliamente distribuidos en nuestro planeta y se encuentran principalmente representados por lagos salinos como el Gran Lago Salado de Utah o el Mar Muerto, las salinas artificiales generadas para la extracción de sal como las de Santa Pola en Alicante, los fondos oceánicos en los que la concentración de sales puede variar entre 2.5 y 5.2 M, los suelos salinos y las minas de sal (Antón *et al.*, 2000; Oren, 2002a; 2011a; Ventosa, 2006).

Los hábitats hipersalinos se catalogan como extremos y se caracterizan por el elevado estrés osmótico al que se encuentran sometidos los organismos que habitan en ellos, la baja actividad de agua (a_w), así como una alta capacidad de desnaturalización debido a la elevada fuerza iónica. A su vez, estos hábitats pueden considerarse poli-extremos debido a que con frecuencia se presentan de forma asociada otros factores ambientales extremos, como condiciones anaeróbicas debido a la baja difusión de oxígeno, episodios de desecación total o parcial del ambiente, altos niveles de radiación solar, valores de pH alcalinos o ácidos, altas o bajas temperaturas, la presencia de metales pesados y/o compuestos tóxicos, o condiciones oligotróficas extremas (Oren, 2002a; Ventosa, 2006; Bowers *et al.*, 2009).

Sin alcanzar los niveles de biodiversidad de ambientes de baja salinidad, los ecosistemas presentes en hábitats salinos pueden llegar a presentar una considerable riqueza de especies (Ventosa *et al.*, 2015), que disminuye a medida que aumenta el grado de salinidad (Benlloch *et al.*, 1996; 2002; Casamayor *et al.*, 2002, Rothrock *et al.*, 2005; Gomariz *et al.*, 2015). En los sistemas próximos a la saturación la comunidades están conformadas mayoritariamente por microorganismos y aunque pueden encontrarse algunos representantes del dominio Eucariota como el alga unicelular *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Eucarya), hongos, e incluso el crustáceo *Artemia salina* (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000; Oren 2002a; 2005; 2011b; Ventosa 2006), los ecosistemas hipersalinos se encuentran a menudo dominados por una biota procariota (Benlloch *et al.*, 1996; Ventosa *et al.*, 2015), en su mayor parte Arqueas, de las cuales la familia *Halobacteriaceae* (*Halobacteriales*, *Euryarchaeota*; Grant *et al.*, 2001) ha sido la más estudiada, así como algunos géneros del dominio Bacteria, cuyo representante más característico es *Salinibacter ruber* (Bacteroidetes, Bacteria; Antón *et al.*, 2002; 2005; 2008). (Para ver más géneros de microorganismos halófilos e hiperhalófilos se recomiendan las revisiones de De la Haba *et al.*, 2001 y Kanekar *et al.*, 2012).

Para sobrevivir y prosperar en ambientes salinos e hipersalinos, los microorganismos halófilos y halotolerantes han desarrollado una serie de adaptaciones fisiológicas específicas. Los principales problemas para la supervivencia en un medio hipersalino lo constituyen el mantenimiento del balance osmótico así como la regulación de los sistemas intracelulares a elevadas concentraciones de sal (Oren, 1999; Kerkar, 2004). En este sentido, los organismos han adoptado dos tipos de estrategias (Oren, 1999): (i) la estrategia más extendida (Kerkar, 2004), y presente en los tres dominios de la vida, consiste en mantener baja la concentración de sales en su interior mediante la síntesis de una serie compuestos orgánicos denominados “solutos

compatibles”, como el glicerol, la glicina-betaina o algunos tipos de aminoácidos, que ayudan a compensar el balance osmótico (Ventosa *et al.*, 1998; Oren, 1999). En este caso, dado que la concentración de sales en el interior es baja, no suelen requerirse adaptaciones en los sistemas intracelulares. Por otro lado (ii), algunos organismos, cómo Arqueas de la familia *Halobacteriaceae*, Bacterias anaeróbicas del género *Haloanaerobiales* y *Salinibacter ruber*, mantienen el equilibrio osmótico concentrando en su citoplasma iones K^+ y Cl^- un poco por encima de la concentración salina del medio (Dennis and Shimmin, 1997; Oren, 1999; Antón *et al.*, 2002). Esta estrategia (“Salt-in”), requiere que el conjunto de sistemas intracelulares esté adaptado a la presencia de altas cantidades de sal para hacer frente a la capacidad desnaturizante de la sal (Dennis and Shimmin, 1997). Estos organismos presentan proteínas con elevado contenido en aminoácidos ácidos (que confieren una carga total negativa) y, en muchos casos, se ha observado que las enzimas de estos organismos necesitan K^+ para mantener su actividad (Dennis and Shimmin, 1997; Capes *et al.*, 2012). A su vez, la mayoría de estos organismos presentan un alto contenido en G+C (Siddiqui & Thomas, 2008), lo cual incrementa la estabilidad del DNA, y en algunos casos, principalmente en Arqueas, presentan modificaciones en la composición de lípidos de membrana, o en el caso de bacterias en la composición de la pared celular, que confieren mayor estabilidad en un medio de alta fuerza iónica (Kates, 1993 Tenchov *et al.*, 2006).

Por otro lado, generalmente los ambientes hipersalinos se caracterizan por una elevada intensidad lumínica (Litchfield, 1998). Para tolerar altas intensidades de radiación solar muchos microorganismos halófilos producen una elevada cantidad de pigmentos carotenoides, que son considerados como un elemento de protección pasivo frente al exceso de radiación y la luz ultravioleta, amortiguando los efectos de *quenching* fotoquímico y la acumulación de radicales libres (Litchfield, 1998; Cockell & Knowland, 1999; Oren & Rodríguez-Valera, 2001; Antón *et al.*, 2002). Algunas Arqueas y Bacterias halófilas presentan además proteínas de tipo retinal (bombas de protones activadas por luz) como la bacteriorodopsina, la halorodopsina o la xantorodopsina que aprovechan la luz solar para la síntesis de ATP (fotosíntesis anoxigénica), la fototaxis, el movimiento flagelar, e incluso la osmoregulación ya que en algunos casos participan activamente en la permeabilidad selectiva a H^+ y Na^+ (Oren 2002b; 2008; Antón *et al.*, 2005; Lanyi & Balashov, 2008). A su vez, se ha observado que los organismos halófilos presentan genomas complejos con varios cromosomas, múltiples copias de genes estratégicos y sistemas de reparación de DNA muy eficaces que exhiben una elevada actividad correctora de daños

(recombinación homóloga, actividad fotoliasa y exonucleasa,...) (Asgarani *et al.*, 1999; McCready & Marcello 2003 y revisión de Kish & DiRuggiero 2012).

Este conjunto de adaptaciones presenta elevados costes desde el punto de vista bioenergético, lo que queda relacionado con la gran versatilidad metabólica que presentan los organismos halófilos en los cuales han sido observados casi todos los tipos de metabolismos conocidos (Oren 1999; 2011c). A su vez, y como consecuencia de adaptaciones a medios cambiantes, algunos organismos halófilos pueden exhibir distintos tipos de metabolismo o son capaces de usar una amplia variedad de aceptores y receptores de electrones (Oren 1999; 2011c; Andrei *et al.*, 2012; Antón *et al.*, 2013). Esta versatilidad, frecuente entre halófilos leves y moderados, se reduce a medida que aumenta la concentración de sales puesto que las condiciones termodinámicas del medio imponen límites a los tipos de metabolismo pueden tener lugar en ambientes hipersalinos (véase Oren 1999; 2011c. Fig. 19). A concentraciones muy elevadas de sal los únicos metabolismos observados han sido la fotosíntesis oxigénica, algunos tipos de fotosíntesis anoxigénica (aunque no queda claro si el ATP generado va encaminado al desarrollo del organismo), la respiración aeróbica, que es la principal vía metabólica en Arqueas de la familia *Halobacteriales*, y en algunos casos se han detectado procesos de desnitrificación, la reducción de arsenatos y la oxidación aeróbica de metano (Oren 1999; 2011c). En algunos casos los procesos observados son dependientes de estado de óxido-reducción del conjunto de aceptores y receptores en la cadena de transporte electrónico, y por tanto del pH, por lo que en condiciones en torno a la neutralidad pueden no tener lugar algunos tipos de metabolismo que si tienen lugar en ambientes hipersalinos alcalinos o ácidos (Oren 1999; 2011c).

En el caso de la fotosíntesis oxigénica, en la mayor parte de los ambientes hipersalinos las cianobacterias constituyen los principales productores primarios en detrimento de microorganismos eucarióticos fototróficos que raramente muestran óptimos de desarrollo a concentraciones salinas por encima del 10% (Oren, 2015). Los márgenes de tolerancia que muestran las cianobacterias a la salinidad pueden ser amplios aunque a medida que se incrementa la concentración de sales desaparecen grupos taxonómicos (Estrada *et al.*, 2004) siendo poco frecuente encontrar cianobacterias a concentraciones por encima del 25% hasta concentraciones próximas a la saturación (36%) donde suele ser dominante el alga *Dunaliella* (Oren, 2015).

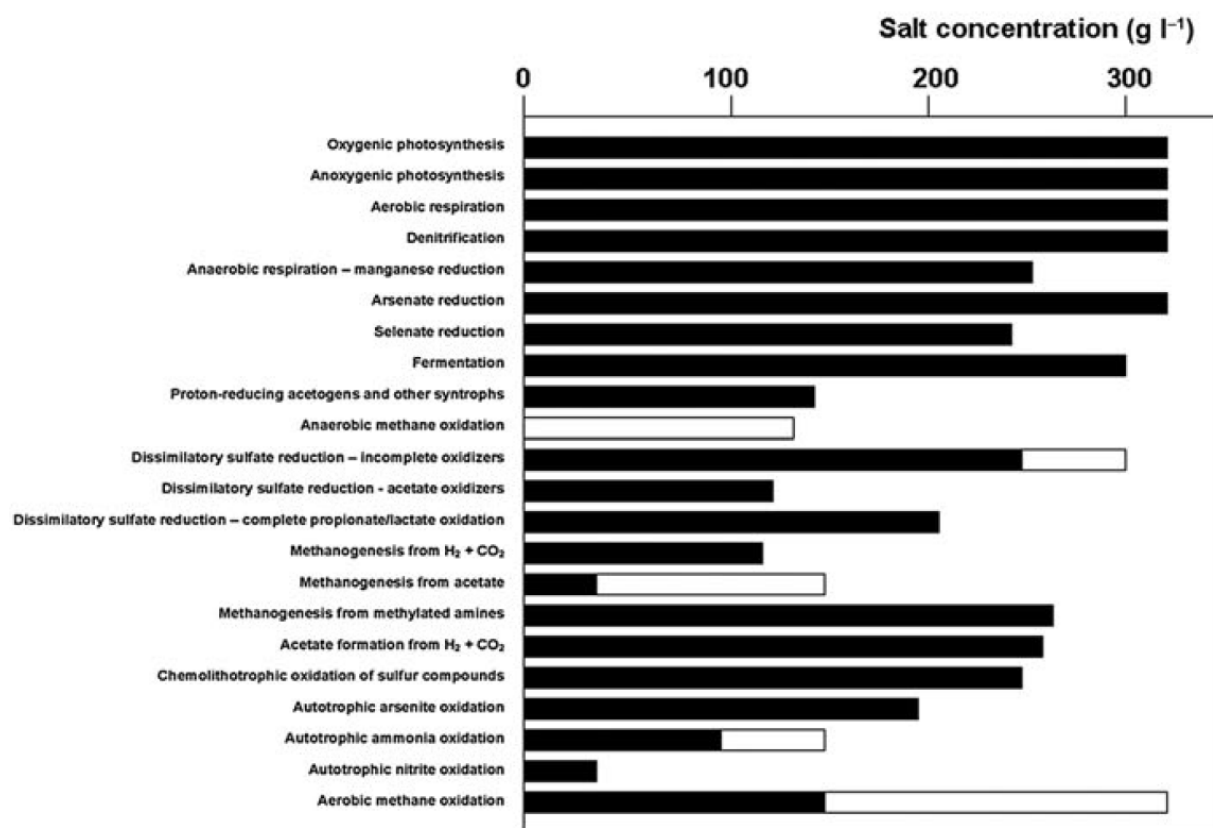


Figura 19: Rangos de concentración salina en la que se observan diferentes procesos metabólicos microbianos. En negro procesos descritos en estudios con cultivos puros. En blanco procesos detectados en la naturaleza como parte de medidas de actividad en ecosistemas hipersalinos. Nota: 360 gr·l⁻¹ es la concentración de saturación para NaCl. Tomado de Oren, 2011.

Debido a su versatilidad y a la capacidad de resistir y desarrollarse bajo numerosos estreses ambientales, los organismos halófilos son concebidos como modelos adecuados para la astrobiología (DasSarma, 2006). El supuesto océano hipersalino bajo la superficie de Europa, luna de Júpiter (McCord *et al.*, 1998; Brack *et al.*, 2001; Marion *et al.*, 2003), la presencia de grandes extensiones salinas (Osterloo *et al.*, 2008) y hallazgos acerca de que actualmente pueda existir agua líquida salina y crio-salmueras en nuestro vecino planetario (Smith *et al.*, 2009; Renno *et al.*, 2009; Zorzano *et al.*, 2009), permiten extrapolar similitudes ecológicas acerca de estos hábitats potenciales que pudieran permitir la supervivencia de organismos halófilos. Incluso aunque no se hallasen organismos vivos, y debido a la capacidad de preservación de las sales (Tehei *et al.*, 2002; Griffith *et al.*, 2008), estos hábitats hipersalinos constituyen lugares preferentes a la hora de encontrar indicios de biomarcadores o indicios de materia orgánica (Toporski & Steele, 2002; Fernández-Remolar *et al.*, 2013; Schinteie & Brocks 2014) que muestren que la biogénesis tuvo también lugar fuera del planeta Tierra. (McKay, 2001)

Más aún, los hallazgos de organismos halófilos viables en el interior de inclusiones líquidas en cristales de sal con millones de años de antigüedad (Norton & Grant, 1988; Vreeland *et al.*, 2000; McGenity *et al.*, 2000; Stan-Lotter *et al.*, 2002; Fendrihan *et al.*, 2007), la presencia de cristales de halita en meteoritos procedentes de Marte (Treiman *et al.*, 2000) y la protección de los cristales de sal frente a la radiación (Cockell & Raven, 2004; Kish *et al.*, 2009) refuerzan la hipótesis de la Panspermia (o litopanspermia) por la cual la vida puede propagarse en el cosmos usando asteroides y meteoritos como vehículos interplanetarios (Experimentos BIOPAN e.g. Horneck *et al.*, 2001, 2003; Sancho *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2010; De los Rios *et al.*, 2010b; De Vera, 2012).

Material y métodos

Material de estudio y Localizaciones de muestreo

Los nódulos de halita constituyen la porción más superficial de algunos de los salares distribuidos a lo largo del área del valle Central del desierto de Atacama y puntualmente en las zonas al este de la Cordillera de la Costa (véase Artieda *et al.*, 2015 Fig. 20). En estos salares estos nódulos salinos pueden presentar altura y tamaño variable, desde pináculos de 20-30 cm de altura y diámetro en torno a 5-10 cm, a grandes bloques amorfos de casi 1 metro de longitud máxima, mostrando en muchos casos formas irregulares a consecuencia de la erosión eólica. La formación de estos nódulos se produce mediante ciclos sucesivos de disolución parcial de la costra basal de sal, al absorber humedad ambiental o durante episodios húmedos ocasionales, y la posterior reprecipitación de sales debido a la elevada evapotranspiración potencial. La eflorescencia que se forma en primer lugar actúa, durante los ciclos de hidratación y secado, como canal de evaporación y punto de nucleación de las sales promoviendo el crecimiento del nódulo cuya evolución se ve favorecida por la acción del viento al generar diferencias en la tasa de evaporación entre la superficie de la costra y la parte superior de la eflorescencia. Como consecuencia de la secuencia de disolución/precipitación de sales, los nódulos presentan un enriquecimiento en NaCl llegando a componer entre el 96-99% de su masa. A su vez, las arenas y arcillas presentes en la superficie de estos salares llegan, en la mayor parte de los casos a integrarse dentro de nódulo a medida que este crece (Artieda *et al.*, 2015).



Figura 20: Imágenes de diferentes nódulos de sal en distintos salares de la Depresión Central (a) y del área de la Costa (b) del desierto de Atacama.

Para los estudios llevados a cabo en la presente Tesis doctoral, y basándose en las observaciones de campo realizadas en abril de 2008, se seleccionaron tres salares situados en diferentes puntos del núcleo hiperárido del desierto de Atacama donde fueron delimitadas cuatro localizaciones de muestreo que presentaban nódulos colonizados y, aparentemente, diferencias en

las condiciones ambientales así como en el patrón macroscópico de colonización: Yungay (YU), Salar de Lllamará (LL), Salar Grande Norte (SGN) y Salar Grande Sur (SGS) (Fig. 21A).

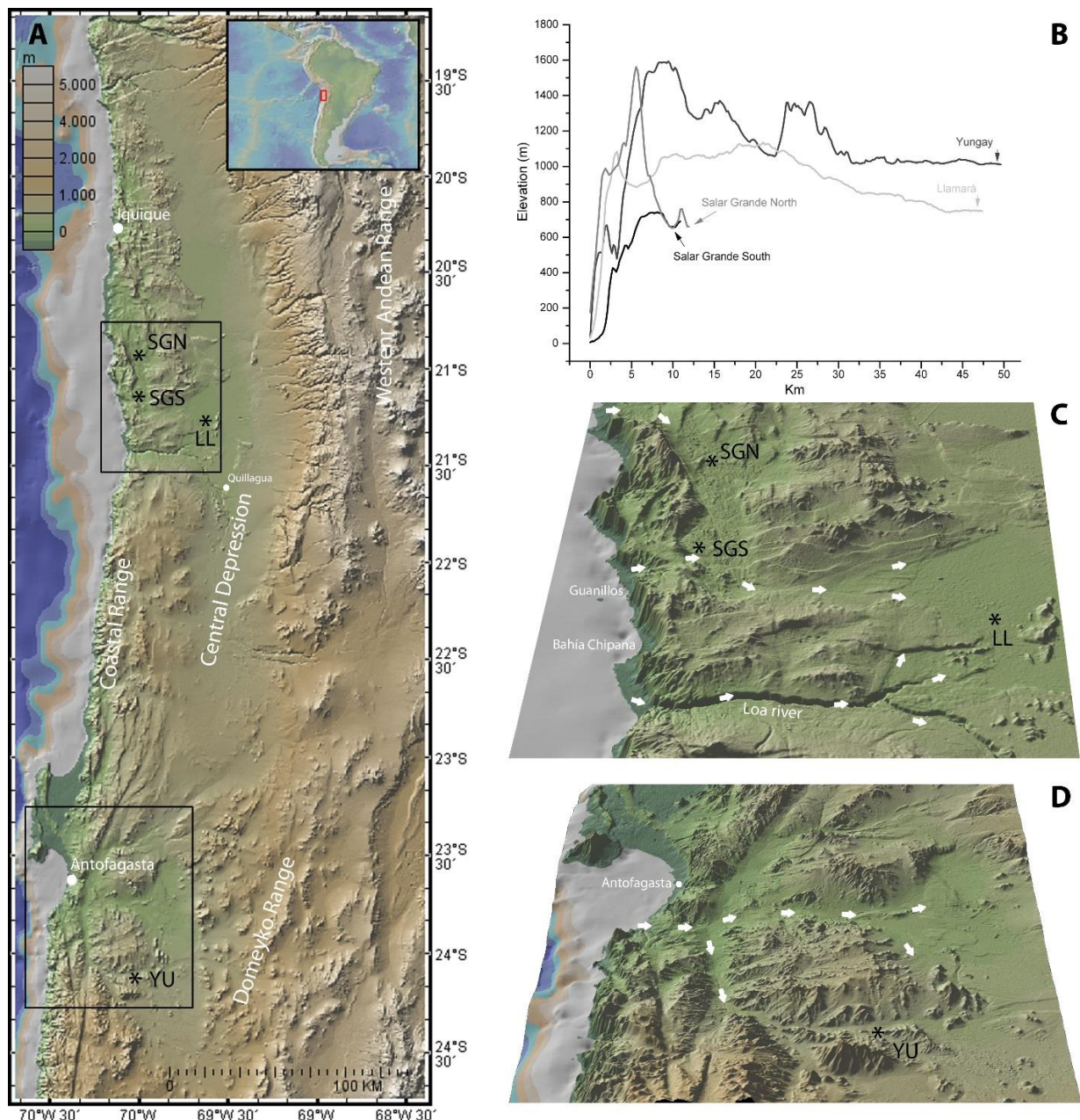


Figura 21: A) Mapa de localización de la diferentes áreas de muestreo a lo largo de Norte de Chile (YU) Yungay, (LL) Lllamará, (SGN) Salar Grande Norte, (SGS) Salar Grande Sur. B) Perfil topográfico Oeste-Este y distancia lineal de las diferentes localizaciones de muestreo en función la costa (Oeste). C) y D) ampliaciones de las áreas de muestreo que muestran las posibles vías de entrada de las nieblas costeras. Fuente GeoMapApp GMRT (Ryan et al., 2009; <http://www.geomapapp.org/>)

- **Yungay** ($24^{\circ}05'01.42''S$, $069^{\circ}54'42.91''O$; elevación ~ 1000 msnm). Localizado en la Depresión Central a 75 Km al sureste de la ciudad de Antofagasta, y a unos 50 Km de la costa, este salar es un campo marginal de halitas situado al noroeste de un antiguo depósito de nitratos

denominado Cantón de Aguas Blancas como resultado de la evaporación de un paleolago (Plioceno-Pleistoceno) y la subsecuente precipitación masiva de sales (Pueyo *et al.*, 2001) (<http://www.siroccominig.com/s/ AguasBlancas.asp?ReportID =109032>). El área de Yungay está considerada como la zona más seca del núcleo hiperárido del desierto de Atacama ($P < 1 \text{ mm a}^{-1}$) (Mckay *et al.*, 2003) debido en parte a que se encuentra flanqueada por dos grandes cordilleras montañosas, la cordillera de la costa al oeste y la cordillera Domeyko por el este, que producen un efecto barrera que potencia las condiciones áridas por bloqueo de las nieblas costeras y las masas de aire andinas (Fig. 21B). A su vez, el salar se encuentra encajado entre otras unidades montañosas más pequeñas que condicionan también la entrada de humedad al salar (Fig. 21D). Los nódulos de sal presentes en la superficie del salar son pináculos irregulares de entre 20-30 cm de altura fuertemente erosionados por el viento en cuya composición pueden encontrarse trazas de yeso y anhidrita como reflejo de las condiciones de aridez (Wierzechos *et al.*, 2006; 2012; Artieda *et al.*, 2015) (Fig. 22a). La mayoría de los pináculos exhiben, a unos 3-6 mm de la superficie, un patrón macroscópico de colonización en banda en forma de capa verde grisácea (Fig. 22b)

- **Salar de Lllamará** (21°13'02.07" S 069°40'02.11" W. ~800 m.s.n.m.). Localizado en Valle Central a unos 131 km al sureste de Iquique y cerca de unos 45 km del Océano Pacífico (Fig 21a y 21b). Este gran salar se encuentra formado por depósitos evaporíticos y detríticos del Plioceno (Demergasso *et al.*, 2004) y se caracteriza por un lado por la presencia de surgencias de aguas subterráneas provenientes de los Andes, que en algunos puntos del salar generan una serie de depresiones salinas, y por otro por la influencia de las camanchacas que consiguen conectar con el salar a través del corredor de nieblas Río Loa-Chipana-Guanillos (Fig. 21c) (Garcés *et al.*, 1996, Cereceda *et al.*, 2002). Las depresiones presentan en muchos casos una elevada salinidad, lo que genera junto con la elevada evapotranspiración potencial, estanques de evaporación hipersalinos (López *et al.*, 1999; Demergasso *et al.*, 2004). El entorno de estas depresiones se encuentra cubierto por una costra salina dura y seca de color pardo rojizo (Fig. 22c), compuesta principalmente por cloruros y sulfatos de unos 5 cm de grosor (Demergasso *et al.*, 2004) donde se forman los nódulos de sal. Las eflorescencias colonizadas presentan en este salar gran diversidad de formas y tamaños desde pequeños pináculos a rocas de 1 metro. Los nódulos colonizados presentan un patrón de colonización en banda en forma de lámina negra-verdosa a unos 3-10mm bajo la superficie (Fig. 22d).

- **Salar Grande** (070°00' W, latitudes 20°45' - 21°45' S, 640-750 m.s.n.m). Este antiguo y extenso salar (45 km de largo en dirección N-S y 5 Km de ancho) está situado en la zona de transición entre el desierto costero y el núcleo hiperárido en una depresión tectónica a unos 80 km al sur de Iquique y a unos 12 km de distancia media a la costa, constituyendo la única cuenca evaporítica intermontana de importancia en la Cordillera de la Costa (Figs 21a y 21c). Compuesto por una capa de roca salina masiva de al menos 162 metros de profundidad (Ericksen, 1993), este salar ha tenido una evolución compleja desde el Mioceno medio, volviéndose hidrológicamente inactivo durante el Plioceno (Chong Díaz *et al.*, 1999). Actualmente la superficie del salar está formada por gruesas capas poligonales de halita casi pura que pueden presentar algunos sulfatos y elementos terrígenos (García-Veigas *et al.*, 1996; Chong Díaz *et al.*, 1999). Debido a la extensión del Salar, la diferente apariencia externa que presentaban los nódulos de sal a lo largo de este y diferencias en el relieve circundante se decidió la designación de dos localizaciones de estudio en este salar: Salar Grande Norte (SGN) (Fig. 22e) y Salar Grande Sur (SGS) (Fig. 22g). Los nódulos en SGN presentan una configuración similar a los encontrados en el Salar de Llamará pero la colonización ocupaba un gran volumen interno de la roca (patrón en volumen) de un color verde claro que se extendía desde los 3-9mm por debajo de la superficie hasta los 40-50mm en algunos casos (Fig. 22f y 22h). Esta zona, debido a la mayor altura que alcanza la cordillera de la costa en este punto (Fig. 21b), se encuentra bloqueada parcialmente de la influencia frontal de las camanchacas y las masas de aire oceánicas (Fig. 21c). Por el contrario, SGS se encuentra situado en una área donde la cordillera de la costa presenta menor altura y que conforma el paso de un corredor de nieblas que va desde bahía Guanillos hasta el Salar de Llamará (Fig. 21c) (Cereceda *et al.*, 2002). En esta localización, las costra salina y los nódulos mostraban evidentes signos de deflación, disolución parcial de sales, así como procesos capilares que evidencian la influencia directa de las nieblas generando un paisaje de grandes bloques poligonales de sal más llano y con menos nódulos (Fig. 22g). Las eflorescencias en esta localización suelen ser grandes y presentan dos tipos de patrones colonización endoevaporítica diferentes, una que forma un lamina de 1mm de grosor de color verde oscuro intenso presente entre 3-4mm por debajo de la superficie en una zona con alto contenido en arcillas (tipo superficial en banda SGS-SUP), y la otra que ocupa un amplio volumen en la porciones más internas de la eflorescencia donde la halita es más pura (como en SGN) y que presenta una tonalidad verde clara (SGS-IN).



Figura 22: Nódulos de halita de las diferentes áreas de muestreo incluidas en este estudio. a) y b) Yungay. Colonización en banda. c) y d) Llamará. Colonización en banda. e) y f) Salar Grande Norte. Colonización en volumen. g) y h) Salar Grande Sur. Colonización en banda (recuadro) y en volumen (círculo).

A continuación se detallan las tres aproximaciones metodológicas seguidas que incluyen diferentes técnicas de análisis y que se encuentran resumidas en la figura 23.

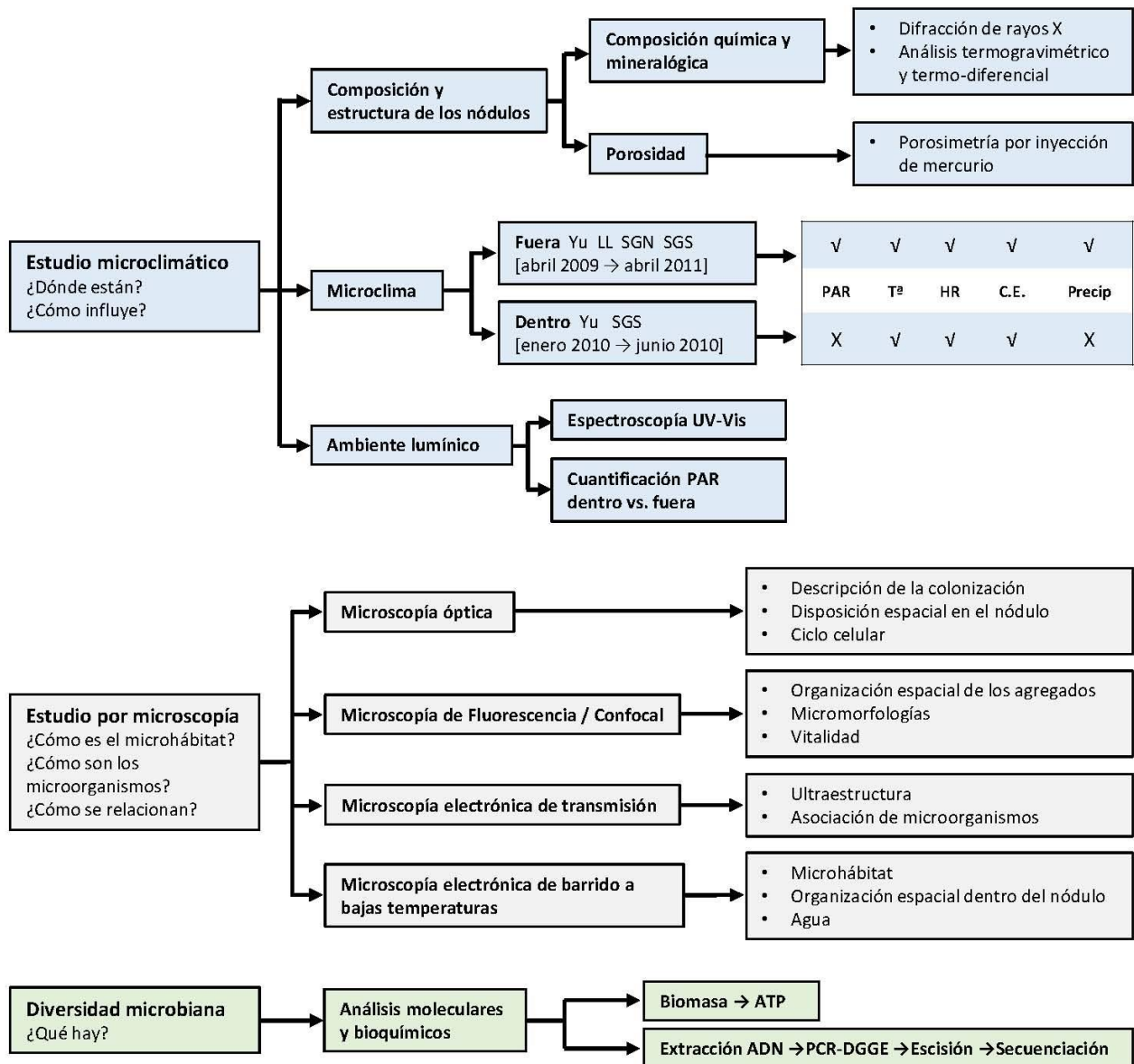


Figura 23: Esquema resumen de las metodologías y técnicas de análisis utilizadas en la Tesis Doctoral.

Descripción ambiental

Composición química y mineralógica

Para el estudio de composición química y mineralógica se recogieron, durante la campaña de campo de 2009, fragmentos de cinco eflorescencias de halita de cada una de las localizaciones de estudio. Con ayuda de un bisturí, se seleccionó y se extrajo porciones de roca de la banda de colonización de cada una de las muestras, en condiciones de esterilidad.

La composición mineralógica de las muestras de halitas fue determinada mediante análisis semicuantitativos por Difracción de Rayos X (DRX). llevados a cabo en un difractómetro Bragg-Brentano theta/2theta PANalytical X'Pert PRO alpha1, radiación CuK(α) con un detector D-500 X'celerator (Siemens, Karlsruhe, Alemania).

El estudio de la composición química de los nódulos se realizó a través del análisis termogravimétrico y térmico diferencial y la cuantificación de materia orgánica total fue llevada a cabo por digestión, con ácidos y por combustión, y medida posteriormente en un espectrómetro de emisión de plasma ICP Perkin Elmer Optima 4300 DV.

Estudio microclimático

Bajo dos aproximaciones diferentes, y a fin de entender el efecto de los factores ambientales sobre la supervivencia y composición de las comunidades microbianas presentes en los nódulos de halita, se colocaron, durante una campaña de campo en abril de 2009, distintas estaciones microclimáticas en cada zona de estudio.

En primer lugar, para la caracterización del microclima en el entorno de los nódulos de cada localización de estudio y poder evaluar posteriormente la influencia del microclima en la estructura de las comunidades microbianas, se realizó una monitorización de dos años, desde abril de 2009 a abril de 2011, de la temperatura y la humedad relativa mediante sensores autónomos equipados con registrador de datos *HOBO® Pro v2 U23* (Onset Computer Corp., Bourne, MA, USA).

Por otro lado, para una descripción más exhaustiva del microhábitat y comprender qué elementos ambientales en el interior de los nódulos facilitan la colonización y supervivencia de

las comunidades microbianas en un entorno como el desierto de Atacama, se colocaron (en 2010) en aquellas localizaciones que *a priori* más se diferenciaban entre sí, Yungay y Salar Grande Sur (tomados los datos de 2009 como referencia), estaciones microclimáticas autónomas *HOBO® H-21-002 Microweather Station* conectadas a un transmisor de datos por satélite (SolarStream® solar-powered transmitter) a través de la red Iridium Satellite Constellation (Fig. 24) equipadas con:

- Un sensor de radiación fotosintéticamente activa (400-700nm) *HOBO® Photosynthetic Light (PAR) Smart Sensor*. Rango de medidas 0-2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- Un registrador de precipitaciones *Rain-o-Matic 100* (resolución 1mm)
- Dos sensores de T/HR *HOBO® S-THB-M002* (precisión $\pm 2.5\%$ HR/ $\pm 0.2^\circ\text{C}$). Uno de los sensores se colocó en el interior de la roca, introducido por un orificio de 5mm de diámetro taladrado desde la base hasta la zona de colonización 8-10mm de la superficie y sellado con *parafilm* a presión para aislarlo de atmósfera exterior. El segundo sensor se colocó en el exterior a unos 5cm de la superficie y protegido de la radiación solar directa de este modo los datos obtenidos reflejan la temperatura del aire y el calor irradiado por los nódulos y la superficie de los salares.
- Dos sensores de voltaje/conductividad uno dentro del nódulo y otro en la superficie. Estos sensores consisten en dos pares de hilos conductores de platino (diámetro 0,8 mm) colocados paralelamente y separados 10mm entre sí, conectados cada par a un adaptador de entrada de voltaje de 12 bits (*HOBO S-VIA-CM14*) que proporciona una señal de voltaje (Voltaje 2,5 V \pm 2,4%; corriente máxima: 1 mA) que alimenta los sensores externos y a un disparador de colector abierto. Cuando se establece contacto entre ambos hilos por la presencia de un elemento conductor (en este estudio agua líquida) se activa el disparador y se detecta un aumento de conductividad eléctrica (CE) desde un voltaje de línea de base de 0,0006 V hasta 2,5 V. Los hilos de platino externos se fijaron firmemente a la superficie nódulo con resina Araldite ®. Para los sensores internos se taladraron desde la base del nódulo hasta la zona de colonización dos orificios paralelos de 1mm de diámetro que fueron selladas con silicona tras la introducción de los hilos conductores.

Para poder llevar a cabo el estudio comparativo, todos los registradores fueron sincronizados y programados para recoger medidas simultáneas cada 30 minutos. Los datos en bruto obtenidos

de las estaciones microclimáticas fueron procesados en primer lugar mediante el software HOBOWare Pro 2.3.0 (Onset Computer Corp., Bourne, MA, USA). La minería de datos, la estadística descriptiva y la graficas fueron realizadas con el paquete de software OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Con los datos anuales se realizó un cluster de dos vías mediante el software estadístico PAST v 2.17 (Hammer *et al.*, 2004).

El periodo de medida de este estudio inicialmente abarcaba un año completo que se vio reducido al periodo desde el 25 de enero de 2010 a 26 de junio de 2010 por un fallo en la estación colocada en SGS (La estación de Yungay tiene un registro más extenso aunque no se muestra en este estudio).



Figura 24: Estaciones microclimáticas. A) Estación colocada en Yungay. B) Detalle de la disposición de los distintos sensores. En negro sensor PAR, en rojo T/HR exterior, en verde T/HR interior y CE interior, en azul Precipitación. C) Detalle de la colocación de los sensores de T/HR y CE en el exterior e interior de la roca. En rojo detalle del sensor CE colocado en superficie. D) Estación colocada en Salar Grande Sur.

Estructura porosa de los nódulos de sal.

Para estudiar la porosidad y la distribución de tamaño de los poros de los diferentes nódulos de sal se utilizó la porosimetría por intrusión de mercurio (MIP) que establece una correlación

entre el diámetro de poro intruído por el mercurio y la presión necesaria para que se produzca tal intrusión. Para el análisis de la porosidad total, así como la distribución del tamaño de los poros en los nódulos de sal colonizados, se prepararon 6 pequeños bloques de cada área de estudio, 3 de la zona superficial de la eflorescencia y 3 de la zona colonizada, que fueron desecados al aire durante una semana a 20 °C y 20% de HR, y después, ,previo a los análisis, secados en estufa a 105 °C durante 24 horas y desgasificados a vacío bajo 1.33 Pa de presión y 20 °C de temperatura. Los ensayos fueron llevados a cabo en un Autopore IV 9500 (Micromeritics Instrument Corporation) y los valores implementados en la ecuación de Washburn fueron 0,48 Nm⁻¹ para la tensión superficial del mercurio y 141,3° de ángulo de contacto entre la sal y el mercurio. El modelo de la ecuación de Washburn asume que los poros del material son cilíndricos (véase Benavente *et al.*, 2003; Hajnos *et al.*, 2006).

Ambiente lumínico

Por un lado, para evaluar la calidad de la luz en el interior de los nódulos se realizaron en mayo de 2009, durante una estancia en NASA Ames Research Center, una serie de ensayos en laboratorio mediante espectroscopía UV-visible a diferentes profundidades de una de las eflorescencias de Yungay bajo la supervisión del Dr Nathan E. Bramall. Para ello, en primer lugar se prepararon láminas finas de unos 6mm de grosor para testar el equipo. Posteriormente y con un nódulo intacto se realizaron perforaciones a distintas profundidades desde la base del nódulo por la que se introdujo un tubo de fibra óptica conectado a un espectrómetro Ocean Optics HR4000CG-UV-NIR. La luz incidente se generó con dos lámparas diferentes, una de deuterio para cubrir el rango UV y otra halógena de cuarzo-tungsteno para el rango visible e infrarrojo (Oriel Corporation) (Fig. 25a, 25b y 25c).

Por otro lado, para valorar la cantidad de luz implicada directamente en los procesos de fotosíntesis se realizó un experimento introduciendo los mismos sensores PAR colocados en las estaciones microclimáticas de las localizaciones de muestreo (*HOB0® Photosynthetic Light (PAR) Smart Sensor*) (Fig. 25d y 25e). Para equiparar y realizar un estudio comparativo entre nódulos de Yungay y de SGS, se prepararon láminas finas circulares de grosor equivalente a la distancia observada de la colonización en cada caso, 6mm en Yungay y 9mm en SGS (Fig. 25f y 25g). El control de la radiación incidente se llevó a cabo con una lámpara Olympus TL2 que presenta cuatro intensidades de luz diferentes. Las medidas se tomaron con los nódulos secos y

húmedos (cámara a 100% HR equilibrio en halita 75% HR) a fin de evaluar diferencias cuando se dan las condiciones favorables para la fotosíntesis.



Figura 25: Estudio del ambiente lumínico en el interior de los nódulos a) Diseño de estudio de calidad de luz. b) Nódulo de Yungay iluminado por lámpara halógena de cuarzo-tungsteno. c) Corte transversal del nódulo de Yungay. d y e) Diseño del estudio de medición de cantidad de radiación PAR. f) Lámina fina. g) Paso de luz a través de la lámina fina.

Caracterización de la colonización microbiana mediante técnicas de Microscopía

La combinación de distintas técnicas de microscopia ha demostrado ser una potente herramienta para el estudio ecológico de comunidades microbianas (Wierzechos & Ascaso, 1994; Ascaso *et al.*, 1995; 1998; Ascaso & Wierzechos 2002; 2003; De los Ríos *et al.*, 1999; 2003; 2004; 2005; 2010; 2014b; Wierzechos *et al.*, 2004; 2006; 2011; 2013; 2015). Por ello se llevaron a cabo estudios mediante distintas técnicas de microscopia:

Microscopia Óptica: Estereoscópica, de Campo Claro y Contraste Interferencial.

En primera instancia, se caracterizaron bajo el microscopio estereoscópico Nikon SMZ745 acoplado a una cámara digital Nikon D5100 varias porciones colonizadas de los nódulos de sal de cada área de muestreo. Para su visualización las diferentes muestras fueron hidratadas con humedad relativa (HR) cercana al 100% en cámara húmeda la noche previa.

Con el fin de observar la disposición *in situ* de los microorganismos dentro de los nódulos se prepararon láminas finas (aproximadamente 1mm de grosor) de áreas de halita colonizada, en estado deshidratado mediante una cortadora de precisión con disco de diamante. Las láminas obtenidas se observaron bajo un microscopio óptico AxioImager D1 Zeiss equipado con una cámara CCD en color (AxioCam MRc Zeiss).

Por otro lado se realizaron preparaciones a partir de 0,2 gr de halita colonizada disuelta en agua bidestilada y autoclavada. La disolución se realizó por goteo y bajo agitación manual hasta la completa disolución de los cristales de sal. Para realizar las preparaciones, el material disuelto se concentró por centrifugación en una microcentrifuga durante 15 segundos, colocando 20 µl del sedimento concentrado en el fondo del *eppendorf* en un portaobjetos. La visualización se llevó a cabo en un microscopio AxioImager D1 Zeiss equipado con una cámara CCD en color (AxioCam MRc Zeiss) y un objetivo de inmersión Plan-Apochromat 63X / 1.4 NA Zeiss. Las observaciones se realizaron en Campo Claro y con la técnica de Contraste Interferencial (DIC)

Microscopía de Barrido Láser Confocal (CSLM) y Microscopía de fluorescencia.

Para los estudios por CSLM, se disolvieron 0.2 gr de fragmentos colonizados de nódulos de halita previamente hidratados de cada zona de muestreo, añadiendo gradualmente una solución acuosa de NaCl al 20%, manteniendo alta y constante la salinidad de la muestra durante la disolución. El material disuelto fue posteriormente concentrado por centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos. Desechado el sobrenadante, los distintos sedimentos obtenidos fueron colocados sobre portamuestras de microscopía óptica para su tinción con distintos fluorocromos.

Por un lado, se aprovechó la autofluorescencia de la clorofila a y las ficobilinas (rango de excitación entre 640-785 nm cuando se ilumina con diodo laser $\lambda = 561$ nm) para detectar las cianobacterias y se realizó una tinción de las muestras durante 10 minutos y en oscuridad con 10 μ l de una solución 1:1000 (vol/vol) de SYBR Green I (Molecular Probes) para poder observar el resto de microorganismos. Este fluorocromo es capaz de unirse específicamente a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y presenta un emisión máxima (señal verde $\lambda = 521$ nm) cuando se excita la muestra con un láser de argón ($\lambda = 488$ nm). Por otro lado, se realizó un test de viabilidad (descrito en Wierzechos *et al.*, 2004 y Falcioni *et al.*, 2008) añadiendo a la muestra, previamente teñida con SYBR Green I (Molecular Probes), 10 μ l de yoduro de propidio (Sigma Chemical Co.) a concentración final 10 μ g/ml, cuya emisión máxima cuando se excitan con un láser de argón ($\lambda = 488$ nm) es 617nm (Rojo). Esta prueba se basa en las propiedades de penetración de estos marcadores a través de la membrana celular, dado que la membrana es permeable para el SYBR Green I mientras que es impermeable al yoduro de propidio. De esta forma, únicamente aparecen marcados con yoduro de propidio aquellos organismos que presentan daño en su membrana celular. Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal LSM 310 Zeiss (Jena, Germany) equipado con un objetivo de inmersión Plan-Apochromat 63X/1.40 NA Zeiss). Las diferentes series ópticas obtenidas de las muestras fueron procesadas posteriormente con el software del microscopio confocal para obtener una reconstrucción tridimensional (3D) de la muestra proporcionando una imagen que reproduce la disposición espacial de los microorganismos en la muestra.

Para los análisis por microscopía de fluorescencia se disolvieron 2 gr de la porción colonizada de un nódulo de cada localización de estudio, hidratados previamente durante un día en cámara húmeda (cristalizador con lámina de agua y el nódulo sobre una rejilla sin entrar en contacto con el agua). La disolución en este caso se realizó en agitación manual suave y añadiendo a la porción de halita soluciones de concentración decreciente de agua salina estéril para evitar el choque

osmótico. Primero se añadió agua salina estéril al 20% de NaCl, luego al 10% y finalmente agua pura hasta la completa desaparición de los cristales de sal. La disolución resultante fue fijada durante 2 horas a 4°C con formaldehído (4% concentración final) y filtrada posteriormente a vacío recogiendo los microorganismos en discos de filtración estériles (GTTP 02500 Millipore 0,22µm diámetro de poro). A continuación, los filtros fueron depositados sobre una gota (aprox. 10µl) una solución 1µg/ml de DAPI (4'-6'-diamino-2 fenilindol) durante 1 minuto. Los filtros fueron posteriormente lavados en primer lugar con agua mili-Q seguidos de un lavado con etanol al 80% y se dejaron secar al aire. Durante el montaje en el portaobjetos se añadió Citifluor (Citifluor Ltd., London, UK) como protector de la fluorescencia (agente anti-fading). Los filtros fueron estudiados en un microscopio AxioImager D1 Zeiss equipado con una cámara CCD en color (AxioCam MRc Zeiss), un objetivo de inmersión Plan-Apochromat 63X / 1.4 NA Zeiss y un filtro de fluorescencia específico para DAPI, Filtro Set 49 (Zeiss) con una λ de excitación de 365 nm y de emisión de 420–470 nm.

Microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LT-SEM).

Para realizar una caracterización del microhábitat y visualizar la organización espacial de las comunidades microbianas en su estado “natural” en el interior de los nódulos de halita se utilizó en las muestras la microscopía LT-SEM. Esta técnica permite el estudio de las comunidades sin procesamiento químico alguno, porque las muestras se estudian en estado congelado. Es por ello que esta técnica posibilita la visualización de las muestras en estado hidratado y localizar en ellas relictos de agua y salmuera en la estructura porosa de la roca (Brown *et al.*, 1987; De los Ríos *et al.*, 1999; Ascaso *et al.*, 2002; Souza-Egipsy *et al.*, 2002; Wierzchos *et al.*, 2006; 2012; 2013).

Para ello, varios nódulos de halita de cada una de las localizaciones en estudio fueron introducidos en un cristizador estéril donde fueron sometidos a un ciclo de hidratación de 48h bajo luz ambiental (dos ciclos diurno-nocturno), a temperatura ambiente y bajo una humedad relativa controlada en torno al 70-80%. El valor controlado de humedad se obtuvo mediante una mezcla de glicerol y agua depositada en el fondo del cristizador, sin entrar en contacto con las muestras de roca. Posteriormente se seleccionaron porciones internas de los nódulos de halita que se mostraban colonización a nivel visual para su observación por LT-SEM.

Cada una de las muestra fue fijada mecánicamente al portamuestras del sistema de criotransferencia (Oxford CT 1500) con ayuda del compuesto O.C.T. (Gurr). A continuación las

muestras fueron introducidas en nitrógeno líquido subenfriado a vacío ($T^a = -210^{\circ}\text{C}$) y transferidas inmediatamente en vacío a la unidad de preparación del microscopio electrónico de barrido donde fueron criofracturadas. Una vez trasladadas las muestras dentro de la cámara del microscopio, se realizó en ella una sublimación del hielo congelado de la superficie de la muestra (etching) mediante una subida a -90°C durante 2 minutos. Después, la muestra se traslada de nuevo a la cámara de preparación acoplada al microscopio, donde fue sombreada con una capa de oro (100-200 Å), la cual actúa como conductor. Posteriormente la muestra es reintroducida en la cámara del microscopio para su observación. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido DSM960 Zeiss equipado con detectores de electrones retrodispersados y de electrones secundarios. El potencial de aceleración fue de 15kV y la distancia de trabajo de 15 mm. Durante los estudios por LT-SEM, se llevaron a cabo análisis por dispersión de energía de rayos X (EDS System Link ISIS Oxford) que nos aportaron información de la composición elemental cualitativa de zonas de interés de la muestra. La altura de trabajo durante las tareas microanalíticas fue de 25mm.

Microscopia Electrónica de Transmisión

Para estudio ultraestructural de los microorganismos presentes en los nódulos de sal se realizaron preparaciones para microscopía electrónica de transmisión siguiendo el protocolo descrito en De los Rios & Ascaso (2002) con modificaciones (De los Ríos *et al.*, 2010). En resumen, los fragmentos de halita fueron fijados con una solución de glutaraldehído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) al 3% en 5M de NaCl en frío y durante 3 horas y posteriormente en una solución al 1% de tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) en tampón fosfato sódico (100mM, pH 7.1) durante 5h. Tras la fijación las muestras fueron deshidratadas en series de concentración creciente de etanol y embebidas en resina Spurr (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, Spurr 1969). La resina fue polimerizada por someterse a -70°C durante 24h. Posteriormente se obtuvieron secciones ultrafinas que fueron depositadas en rejillas y teñidas con citrato de plomo (Reynolds, 1967) previamente a su observación. El estudio de los cortes ultrafinos se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM910 equipado con una cámara CCD Gatan (1024 x 1024 p) y potencial de aceleración de 80kV.

Descripción de la diversidad microbiana

Se estima que sólo un 1% de la diversidad microbiana en ambientes naturales puede ser identificada mediante aproximaciones clásicas de cultivo (Amann *et al.*, 1995). Esto es especialmente relevante en el caso de los organismos extremófilos, los cuales presentan requerimientos ciertamente exóticos para su crecimiento. Es por ello que en las últimas dos décadas, el estudio de la diversidad procariota mediante el uso de métodos moleculares basados en la amplificación de los genes que codifican para el ARN ribosómico 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos y su posterior secuenciación, se ha establecido como herramienta básica en la ecología microbiana.

Con objeto de caracterizar la diversidad genética y evaluar diferencias en la estructura de la comunidad procariótica entre los distintos nódulos de halita, durante la campaña de campo llevada a cabo en enero de 2010, se recogieron nódulos superficiales de halita enteros procedentes de cada uno de los cuatro puntos de estudio designados. Los nódulos recogidos fueron introducidos *in situ* en bolsas de polietileno estériles (Whirl-Pak) y etiquetados para su procesamiento posterior en laboratorio dos semanas después en Madrid. Las muestras se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente.

Extracción de ADN.

Para la extracción del material genético, los nódulos completos fueron fracturados en laboratorio bajo condiciones asépticas en una campana de cultivo previamente esterilizada. Con ayuda de un bisturí estéril fue extraído en seco 2 gr de halita de la zona colonizada de cinco nódulos diferentes de cada zona de estudio. Posteriormente, el material extraído fue disuelto con agitación manual suave con concentraciones decrecientes de agua salina estéril hasta la completa desaparición de los cristales de sal. Esta solución fue centrifugada a 13 g durante 30 minutos y se recogió el precipitado para la extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó mediante el Kit comercial *UltraClean Soil Microbial DNA Isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc., Solana Beach, Calif.) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El ADN extraído de las distintas muestras ambientales fue preservado a -20 °C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa. (PCR)

La amplificación parcial del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal de los grupos procariotas presentes en el ADN total extraído para su uso en la DGGE, se realizó mediante una PCR con dos conjuntos de cebadores específicos, 341fGC y 907r, para el dominio Eubacteria (Muyzer *et al.*, 1995), y la pareja A109f (Groskopf *et al.*, 1998) y GC515r (Lane, 1991) para el dominio Archaea. Los cebadores marcados con GC incluían una cola de 40 oligonucleótidos rica en G+C a fin de evitar la desnaturalización completa de la doble hebra de ADN durante la electroforesis.

Los cebadores (10 pmol mL⁻¹) junto con 7-12 µg/µl de ADN molde y agua estéril *Ultra-Pure water* fueron adicionados a una mezcla de reacción de PCR comercial *PuReTaq ReadyTo-Go-PCR Beads* (GE Healthcare) hasta un volumen final de 25mL. El proceso de amplificación fue llevado a cabo en un termociclador MJ Minitm (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: un primer paso de desnaturalización (5 min a 95°C), seguido de 35 ciclos que incluyen un paso de desnaturalización (1 min 95 °C), un paso de alineamiento (1 min a 52 °C para arqueas/ 1min 60 °C para bacterias), y un paso de elongación (1 min 72 °C). Al final de los 35 ciclos se realizó un paso final de elongación de 30 min a 72 °C.

La constatación de la amplificación de productos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% que incluía SYBR-safe 10000X (Invitrogen) a concentración 1:10000, durante 30 minutos a 90V. El Gel se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta.

Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La DGGE se ha mostrado como una herramienta apropiada y versátil para el estudio de la estructura de comunidades microbianas (Muyzer *et al.* 1993, 1995, 1999). Distintos autores han aplicado con éxito esta técnica al estudio de la ecología de distintos grupos microbianos: hongos (Arenz *et al.*, 2006; Möhlenhoff *et al.*, 2001; Vainio & Hantula 2000), cianobacterias (García-Pichel *et al.* 2001; Sigler *et al.*, 2003). Eubacterias y Arqueas (Casamayor *et al.*, 2001, 2002). Enmarcada dentro de los métodos de “fingerprinting” molecular, esta técnica permite la separación de productos de PCR de igual longitud y diferente secuencia, basándose en la desnaturalización parcial de la doble hebra de ADN durante su migración en una electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida al que se le aplica un gradiente lineal de urea-formamida y una

temperatura constante de 60°C. Bajo estas condiciones, cada cadena de ADN va reduciendo su movilidad electroforética a lo largo del gel debido a la disociación de la doble hebra de ADN a medida que aumenta la desnaturalización hasta quedar detenida en un punto concreto del gel. Como la desnaturalización presenta dependencia directa de la secuencia de oligonucleótidos, el resultado final es un patrón de bandas que se corresponde con la diferentes secuencias de ADN presentes en la muestra, permitiendo obtener una imagen o huella de la diversidad genética de una población microbiana (Muyzer *et al.*, 1993, 1995).

Para el presente estudio, los amplicones obtenidos en la PCR fueron separados mediante DGGE usando un sistema *D-Code Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad; Hemel Hempstead, UK). Para ello, se cargaron 22 µl (concentración de ADN entre 7-12 µg/µl) de cada uno de los productos de PCR obtenidos mezclados con 15 µl de tampón de carga (70% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xileno cianol) en cada pocillo de varios geles de acrilamida/bisacrilamida al 6% con un gradiente químico lineal 40-70% de formamida desionizada y urea (siendo solución desnaturalizante al 100% = 40% (v/v) formamida / 7M urea). La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1X durante 16.5 horas a 100V, a una temperatura constante de 60°C. Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido durante 10 minutos en una solución TAE 1x con bromuro de etidio (2µg/ml concentración final) y visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta para su análisis.

Aislamiento y secuenciación de las bandas

Entendiendo que las bandas de mayor intensidad podrían constituir un reflejo de la abundancia relativa de cada grupo en la muestra ambiental (Casamayor *et al.*, 2000), el estudio de la diversidad y el análisis comparado entre las diferentes comunidades presentes en los nódulos de sal se redujo a aquellos grupos dominantes dentro de los perfiles obtenidos por DGGE.

Para ello, una vez analizado el patrón de bandas, se cortaron con una cuchilla estéril aquellas bandas del gel de poliacrilamida que, en función de su intensidad y frecuencia, eran mas representativas de cada comunidad. Cada banda cortada fue introducida en un tubo de *ependorf* que contenía 50 µl de agua bidestilada estéril y se mantuvo a -20°C durante al menos 48h. Previo a una nueva amplificación por PCR, las bandas fueron incubadas a 60°C durante 30 minutos. A partir de la solución resultante se realizó una reamplificación usando los mismos cebadores para

cada grupo que se utilizaron en la PCR inicial pero sin la cola G+C, así como los mismos ciclos de desnaturalización, alineamiento y elongación en el termociclador.

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados utilizando el kit comercial QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en SECUGEN S.L: (Madrid, Spain) mediante secuenciación Sanger.

Análisis de secuencias obtenidas por DGGE

Las secuencias obtenidas de las diferentes bandas con cada uno de los primers fueron revisadas y ensambladas mediante el software SEGMAN II v.5.07 (DNASTAR Inc.). La posible aparición de secuencias quiméricas se testó mediante el servidor Bellerophon (<http://compbio.anu.edu.au/Bellerophon/doc/doc.html>, Huber *et al.*, 2004). Posteriormente y en aras de obtener conjuntos definidos de datos, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias generado por el programa ClustalW implementado en el paquete de software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) asignando las secuencias parciales obtenidas a diferentes OTUs (*Operational Taxonomic Units*) bajo el criterio de 97% de similitud de secuencia (nivel de especie para genes 16S RNAr. véase Rosselló-Mora & Amann, 2001; Tindall *et al.*, 2010) mediante el software MOTHUR (<http://www.mothur.org/>, Schloss *et al.*, 2009). Con el mismo programa se construyó un diagrama de Venn a fin de mostrar los OTUs compartidos entre comunidades de las diferentes localizaciones de muestreo. En función de la presencia y ausencia de cada OTU en cada área de muestreo se realizó un análisis de similitud entre localizaciones mediante el índice de similitud de Sorensen implementado en el software PAST v 2.17 (Hammer *et al.*, 2004)

A partir de las secuencias parciales de genes que codifican para ARNr obtenidas mediante la escisión, amplificación y secuenciación de bandas en los perfiles de DGGE (358-398bp de longitud en el caso de las arqueas y 532-556bp para bacterias), y con el fin de analizar la posición taxonómica de los OTUs detectados, se elaboraron árboles filogenéticos mediante el método de máxima verosimilitud usando el software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Para ello se incluyeron en el alineamiento, las secuencias consenso obtenidas con MOTHUR para cada OTU (bajo criterio de similitud del 99%) junto con las secuencias más próximas obtenidas mediante correlaciones con BLASTn en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y secuencias representativas de los principales linajes. Los árboles se construyeron con MEGA 5 usando el

método de máxima verosimilitud (ML) bajo un modelo de substitución General-Temporal-Reversible con una tasa gamma de heterogeneidad distribuida y una proporción de sitios invariables (GTR + Γ + I) (elegido usando Jmodeltest Posada, 2008). El soporte de la topología de los árboles se midió con un bootstrapping no paramétrico (1000 réplicas).

Estimación de la biomasa microbiana

Entre los diversos procedimientos para la determinación de la biomasa microbiana en muestras ambientales, su estimación a través de la cantidad de adenosin trifosfato (ATP) es un método generalmente aceptado y fiable (Cowan & Casanueva, 2007; Venkateswaran *et al.*, 2003 y referencias en el artículo). De forma habitual los ensayos destinados a la detección y determinación de la cantidad ATP son de carácter luminométrico y están basados en la evaluación de la intensidad luminosa de la luciferasa (Lundin, 2000).

Para la determinación del ATP en este ensayo se tomaron cinco nódulos de halita de cada una de las localizaciones de estudio que fueron procesadas con la misma metodología aplicada durante la extracción de ADN. Tras el centrifugado, con el concentrado celular resultante se utilizó un preparado comercial Biomass ATP kit HS (BioThema AB, Handen, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante. La intensidad de la luminiscencia fue medida en unidades relativas de luz (RLU) usando un luminómetro portátil, Lumitester C-110 (Kikkoman Corporation, Chiba, Japan) fijando el tiempo de integración de señal en 10 segundos: Las RLU obtenidas fueron convertidas a concentración molar de ATP en base a la curva de calibración que incluye el manual del luminómetro: El número relativo de células por gramo de peso seco de halita colonizada fue calculado de acuerdo con la aproximación sugerida en el manual del kit de ATP de una célula por cada 2×10^{-18} mol de ATP.

Resultados

Estudio microclimático I: Condiciones microclimáticas externas

Radiación PAR

Los datos de radiación PAR del año 2010 para las zonas de Yungay y Salar Grande Sur se encuentran recogidos en la figura 26. Como se observa en la figura, durante la segunda mitad del periodo de medidas tuvo lugar un desplazamiento del sensor PAR colocado en SGS respecto a su posición original, perpendicular a la línea de horizonte, posiblemente debido a la disolución parcial y a la erosión eólica de la roca en la que se encontraba anclado. A pesar de la consecuente variación en el valor de la intensidad máxima, estos registros se encuentran incluidos dado que siguen permitiendo la evaluación cualitativa de los datos y su desviación cuantitativa no supone excesivos cambios al nivel de la estadística descriptiva utilizada.

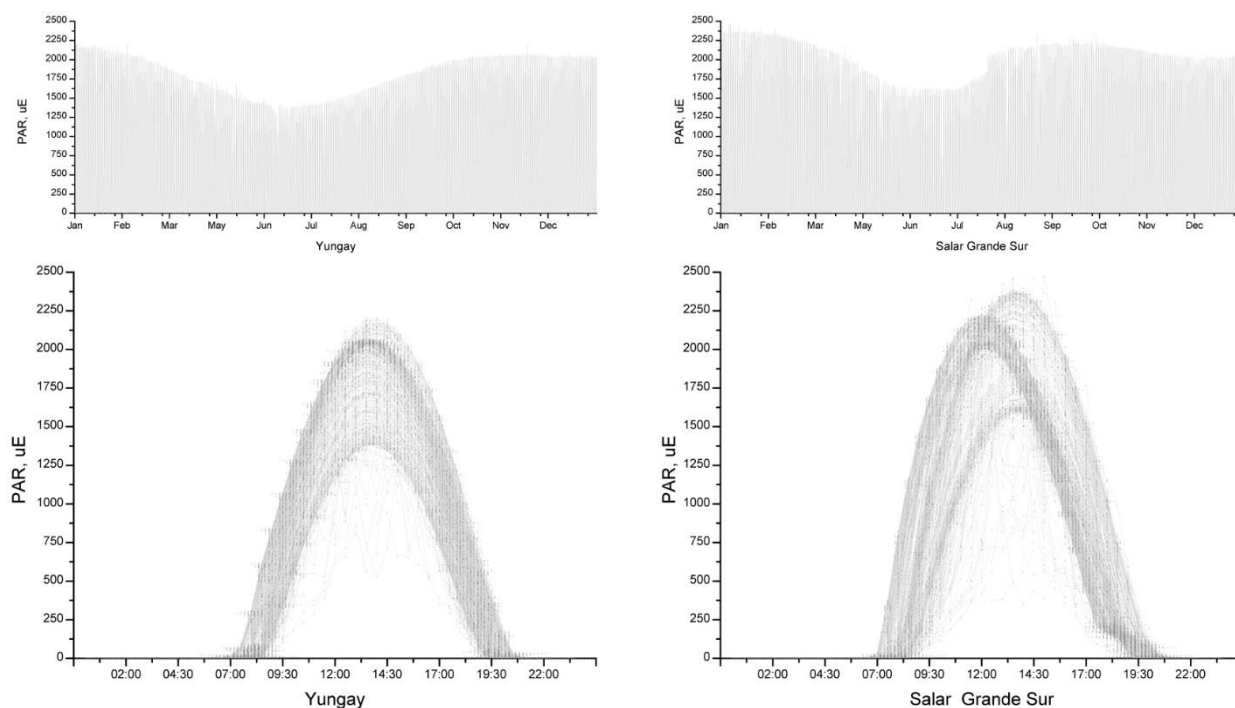


Figura 26. Datos de radiación PAR a nivel de suelo en Yungay (izq) y Salar Grande Sur (dcha). Periodo de medición de 24 de enero de 2010 a 23 enero 2011. Toma de datos cada 30 min. Arriba serie anual continua. Abajo grafica de proyección diaria con todos los datos.

Los datos obtenidos muestran, durante la mayor parte del periodo de medidas, un predominio de los días netamente despejados en ambas localizaciones que se traduce en un comportamiento extremadamente regular a lo largo del día, siendo la única variación cuantitativa perceptible aquella de carácter estacional. Los valores de PAR registrados se consideran altos, cuyos valores máximos en los meses de mayor intensidad solar (desde finales de diciembre a principios de

marzo) se encuentran en torno a los 2200-2400 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ siendo en conjunto algo más elevados en Salar Grande respecto a los valores registrados en Yungay, entendiendo este contraste como un síntoma de su diferente posición latitudinal.

Los días en los que aparecen elementos que bloquean la radiación solar que incide sobre el suelo son más habituales en el área de Salar Grande Sur que en Yungay, y no responden, en ninguno de los casos, a un patrón de frecuencia regular (diario, mensual o estacional). Salvo rara ocasión, en las que se aprecian registros de radiación irregulares o de menor intensidad a lo largo de todo el día, lo que podría ser indicativo de nubes en altura, la mayor parte de estos fenómenos suelen quedar comprendidos a las primeras horas de la mañana o últimas de la tarde, pudiendo llegar a ser interpretadas como bruma, calima o neblina (Fig. 27), fenómenos descritos por Cereceda y colaboradores (2002).



Figura 27: Neblinas en Salar Grande.

Precipitaciones

Durante el periodo de medidas, 23 de mayo de 2009 a 19 de abril de 2011, los sensores de lluvia situados a nivel de suelo en Yungay y Salar Grande Sur no registraron precipitaciones por encima de 1mm (límite del sensor), condición que puede llegar a ser extensible para el Salar de Llamará a través de la extrapolación de los datos de Salar Grande Sur y los datos de las estaciones climatológicas de la Dirección Meteorológica de Chile de Loa-Calama (2260 msnm), situada en la ciudad de Calama, que durante el periodo de medidas sólo registró dos eventos precipitación de 0.6mm y 1mm, y Quillagua, situada en la ciudad del mismo nombre y que no registró ninguno durante ese periodo.

A su vez, los registros de la temperatura del aire en torno a los nódulos de sal en cada localización (ver más adelante) así como la comparación con la temperatura de la roca

(únicamente para los casos de Salar Grande Sur y Yungay) no presentaron valores iguales o por debajo del punto de rocío, por lo que se excluye este como posible aporte de agua al sistema, estableciendo como única fuente de agua, para las cuatro áreas estudiadas, la humedad atmosférica.

Temperatura y Humedad Relativa

En la figura 28 se muestran los datos en bruto de los sensores HOBO® Pro v2 U23 en cada una de las 4 localización de estudio. Las figuras 28a y 28b reproducen, respectivamente, las series de datos de HR y T^a del aire a nivel del suelo correspondientes a los valores registrados cada media hora desde el 23 de mayo de 2009 al 19 de abril de 2011 en cada localización, mostrando, en negro, el valor medio diario para cada variable. La figura 28c muestra el valor de la diferencia entre la temperatura de la masa de aire y su temperatura de punto de rocío calculada para cada registro de forma que los valores negativos indicarían la posible formación de rocío. Los datos ausentes se deben a problemas con el registro de datos.

El examen de estos datos pone de manifiesto, para cada una de las localizaciones, una cierta monotonía en el patrón diario de la temperatura y la humedad relativa, caracterizado por la elevada amplitud de la oscilación a lo largo del día y el comportamiento dependiente y correlacionado negativamente de ambas variables, en la que, de forma general, el mínimo diario de temperatura coincide con el máximo de RH, en torno a las 6-7 de la mañana, y viceversa, la menor humedad relativa coincide con el pico máximo de temperatura hacia las 14:00-15:00. El registro continuado durante dos años permite mostrar una variación estacional regular en cada localización (más marcada en la series temporales de temperatura), cuya escala de importancia a nivel cuantitativo en cada localización, y debido a la magnitud de la oscilación diaria, puede quedar relegada, en un principio, a un segundo plano frente a la variación que se produce a lo largo del día, e incluso a la interdiaria, dado que con relativa frecuencia pueden alternarse días "secos" (HR media entre 30%-40%) y días "húmedos" (HR media por encima del 55%) con independencia de la estación del año (ver picos en los valores medios diarios de HR). En este sentido, y en relación a la importancia de los fenómenos diarios, la variación de estos parámetros a lo largo del día queda reflejada en la figura 29 que aglutina, para cada localización, todos los valores registrados en función de la hora del día y exhibe, a modo de ejemplo, dos series de datos diarias correspondientes a un día considerado como seco (19 julio de 2010) y un día considerado como húmedo (11 agosto de 2010) comunes para cada una de las áreas de estudio.

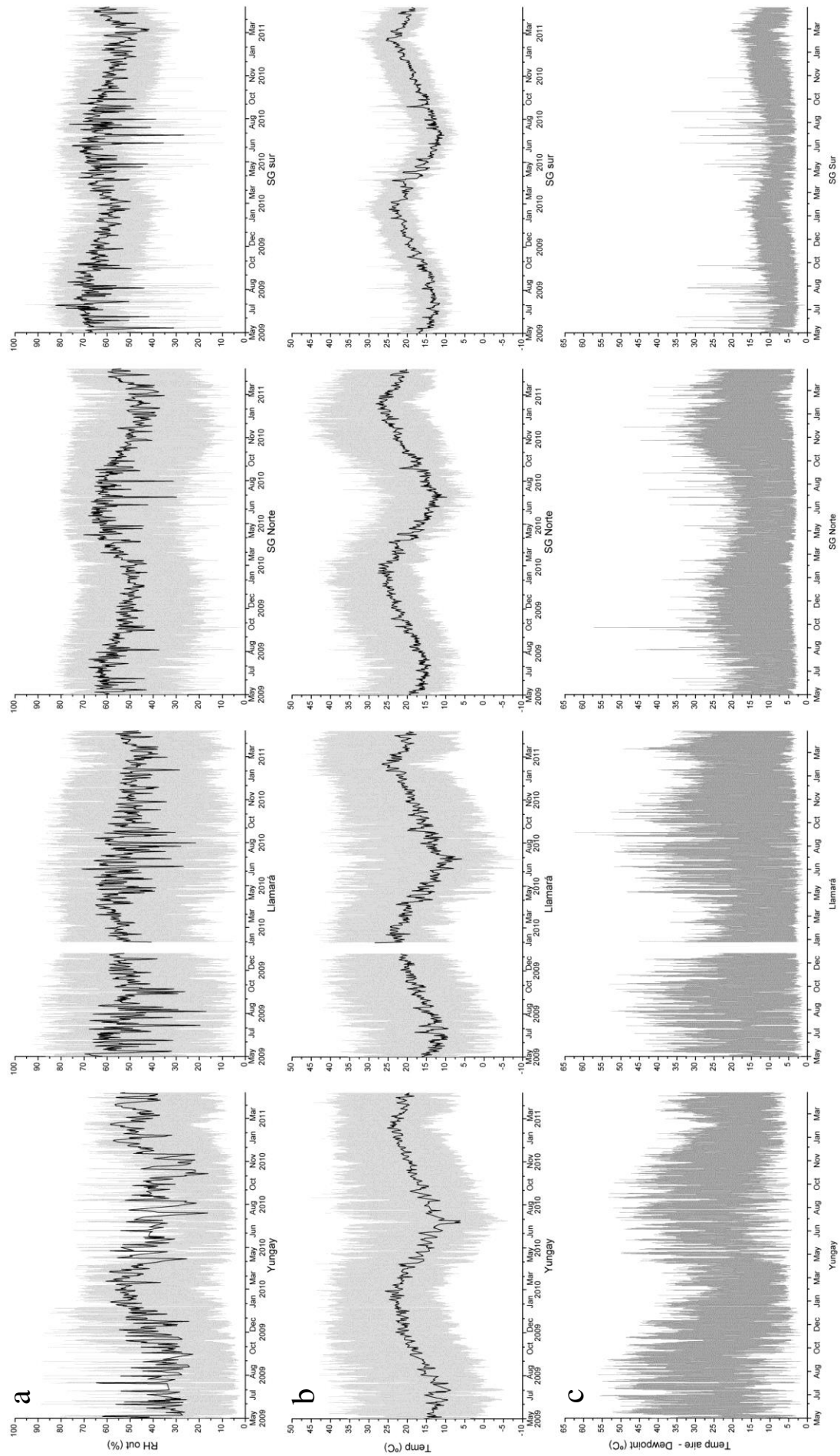


Figura 28: Series completas de los datos registrados cada 30 minutos durante el periodo desde el 23 de mayo de 2009 al 19 de abril de 2011 para la Humedad Relativa (a) y la Temperatura (b). En negro el valor medio diario para cada variable. (c) Describe el valor de la diferencia entre la temperatura del aire y el valor calculado para la temperatura del punto de rocío en el mismo instante de registro.

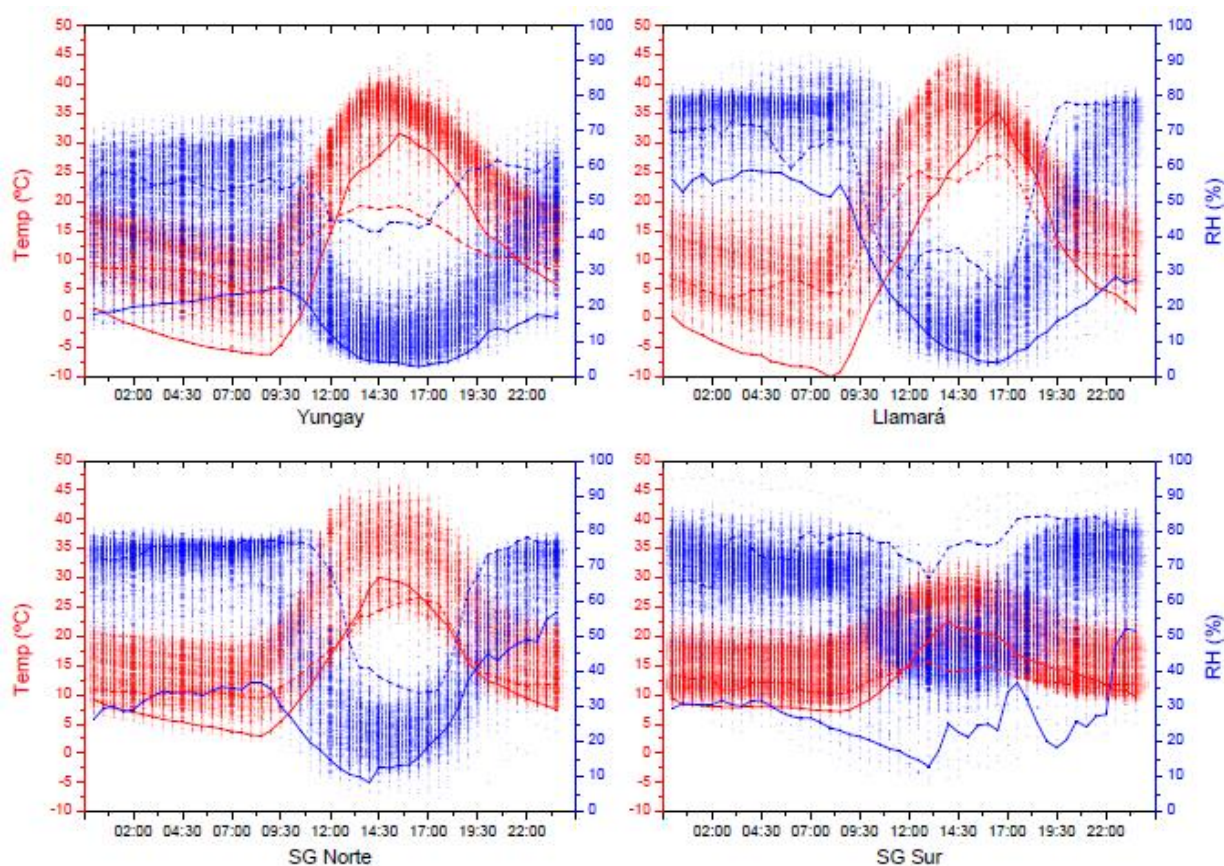


Figura 29: Proyección de 24 h de todos los datos registrados cada media hora durante el periodo de 23 de mayo de 2009 al 19 de abril de 2011 en cada localización. En rojo los valores de temperatura y en azul los valores de humedad relativa. Línea continua exhibe una serie de datos diaria de un día interpretado como seco, en línea discontinua un día considerado húmedo.

Dada la dificultad del análisis de variables con elevada oscilación, y a fin de entender y hacer más manejables los datos obtenidos aprovechando la regularidad microclimática detectada, para el análisis comparativo entre las localizaciones de muestreo se extrajeron, del conjunto de datos de acumulados durante los dos años, el valor medio diario, el valor máximo diario, el valor mínimo diario así como el valor de la oscilación diaria ($-(\text{min} - \text{Max})$) para cada variable y se resumieron en términos de media diaria mensual y anual (Fig. 30 y Tabla 2) y cuyos datos cuantitativos se encuentra recogidos en el anexo III. A su vez y de acuerdo con estudios anteriores (Davila *et al.*, 2008; Martin, 2000; Wierzchos *et al.*, 2012b) se realizó una tabla con los valores acumulativos del tiempo en horas en los cuales la humedad relativa queda en determinados umbrales ($\text{RH} \geq 75\%$ Delicuescencia para NaCl; $\text{RH} \geq 55\%$ Condensación capilar teórica en poros inferiores a 100 nm; $\text{RH} < 40\%$ Eflorescencia para NaCl).

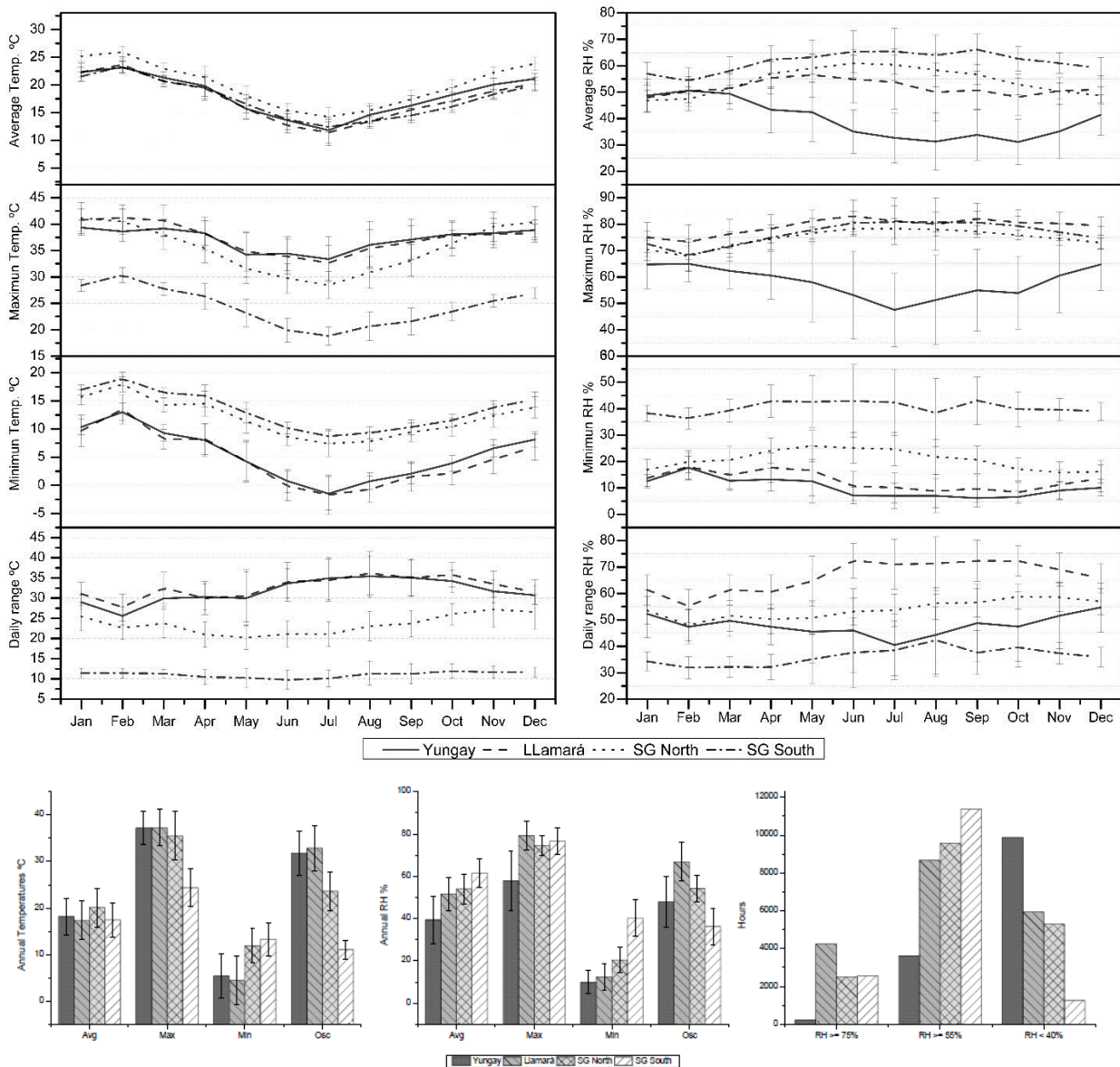


Figura 30. Resumen comparado de los valores mensuales y anuales de T^a (izq) y HR (dcha) en las 4 áreas de estudio. De arriba abajo, estadística mensual del valor medio diario, media de las máximas diarias, media de las mínimas diarias, valor medio de la oscilación diaria (valor máximo diario – valor mínimo diario). Periodo de medición desde el 23 de mayo de 2009 al 19 de abril de 2011 con registro cada 30 minutos. Gráficos de barra con valores anuales para los mismos valores de T (izq) y HR (centro) y el n° de horas acumuladas en distintos umbrales de HR (dcha), se corresponde con tabla 2.

Tabla 2. Valores anuales de T^a y HR y el n° de horas acumuladas en distintos umbrales de HR.

Site	Temperature °C				Relative Humidity %				Time in hours from May 2009 to April 2011 in which:		
	Avg	Max	Min	Osc	Avg	Max	Min	Osc	$RH \geq 75\%$	$RH \geq 55\%$	$RH < 40\%$
Yungay	18,16 ($\pm 3,90$)	37,19 ($\pm 3,61$)	5,39 ($\pm 4,76$)	31,80 ($\pm 4,69$)	39,31 ($\pm 11,11$)	57,91 ($\pm 13,91$)	9,90 ($\pm 5,44$)	48,01 ($\pm 12,17$)	222,6	3609	9881,2
LLamará	17,38 ($\pm 4,08$)	37,29 ($\pm 3,89$)	4,41 ($\pm 5,22$)	32,87 ($\pm 4,89$)	51,59 ($\pm 7,89$)	79,28 ($\pm 6,82$)	12,45 ($\pm 6,47$)	66,83 ($\pm 9,15$)	4242,5	8667,3	5934,8
SG North	20,10 ($\pm 4,15$)	35,50 ($\pm 5,22$)	11,89 ($\pm 3,68$)	23,61 ($\pm 4,07$)	53,96 ($\pm 6,87$)	74,64 ($\pm 4,62$)	20,46 ($\pm 6,17$)	54,18 ($\pm 6,41$)	2507,5	9573,5	5296
SG South	17,43 ($\pm 3,62$)	24,35 ($\pm 4,05$)	13,29 ($\pm 3,50$)	11,06 ($\pm 2,01$)	61,47 ($\pm 6,96$)	76,55 ($\pm 6,23$)	40,25 ($\pm 8,61$)	36,30 ($\pm 8,60$)	2567	11379	1264

Avg = Annual mean of daily average; Max = Annual mean of daily maximum; Min = Annual mean of daily minimum; Osc = Annual mean of daily range; RH = Relative Humidity

Temperatura

En relación a los valores de temperatura, el desierto de Atacama puede ser considerado de forma general un desierto templado, hecho que queda reflejado en los valores de las medias y en relación con las máximas, que no presentan valores excesivamente acusados a nivel del suelo en todas las poblaciones, así como en la escasez de heladas frecuentes, sobre todo cerca de la costa.

Atendiendo a las medias diarias mensuales de temperatura, los datos cuantitativos mensuales y anuales no muestran diferencias entre localizaciones. A su vez, la descripción mensual refleja una estacionalidad térmica similar en cada localización cuya variación se encuentra en torno a los 10 °C entre el verano (Dic-Ene-Feb) y el invierno (Jun-Jul-Ago) austral. En cambio, el desglose de la temperatura en sus componentes máximo y mínimo (media mensual de las máximas diarias y media mensual de las mínimas diarias) revela las diferencias en el comportamiento térmico entre las zonas de muestreo.

En función del máximo de temperatura las localizaciones de estudio pueden subdividirse en dos grupos, uno conformado por Yungay, Lllamará y SGN, cuyas máximas llegan a sobrepasar los 40 °C (máximos registrados 45,06; 46,35; 47.13°C respectivamente), y otro que recoge a SGS, localización que muestra un comportamiento térmico más moderado con valores máximos en torno a los 30 °C en los meses más calurosos (máximo 33,47 °C), y como norma general entre 10-15 °C menores a los registrados en el resto de las localizaciones a lo largo del año. Cabe mencionar que dentro del primer grupo la localización de SGN se distancia, durante los meses de invierno austral, de la pauta marcada por las dos localizaciones de interior presentando valores algo más moderados.

Por otro lado, el mínimo diario de temperaturas divide las cuatro localizaciones en dos grupos que reflejan el carácter continental de cada área. En las localizaciones más alejadas de la costa, Yungay y Lllamará, la temperatura llega a caer por debajo de los 0 °C (mínimo registrado -2,06; y -9,99°C respectivamente) en los meses de invierno, mientras que en Salar Grande la mínima para el mismo periodo no suele bajar de los 7 °C (mínimo registrado 2,13°C en SGN y 6,03°C en SGS). Durante los meses de verano, los valores mínimos a nivel del suelo se encuentran en torno a los 10 °C en las localizaciones de interior y los 15 °C en las localizaciones más próximas a la costa.

A tenor de los datos previos de los valores máximos y mínimos, la oscilación térmica diaria se establece como una variable que resume bien las características térmicas de cada localización.

En relación a esta variable, se pueden establecer tres grupos bien definidos. Por un lado las localizaciones de Yungay y Lllamará, presentan comportamiento cuantitativo prácticamente idéntico con oscilación acusada que llega a alcanzar los 30 °C a lo largo del día, exhibiendo las características propias del desierto absoluto. Por otro lado, Salar Grande exhibe unas condiciones más benignas y muestra dos comportamientos diferentes, reflejando posiblemente la influencia de distintas masas de aire procedentes del océano, de forma que se establecen como (gradiente) zona de transición entre el desierto absoluto y el desierto costero. Y que como se verá a continuación se correlaciona con la presencia de mayor humedad y los efectos moderadores que produce.

Humedad relativa

Respecto a la humedad relativa del aire medida a nivel de suelo, los valores anuales de la media diaria parecen mostrar un ligero gradiente entre las localizaciones siendo la más seca Yungay y la más húmeda SGS. Esta situación llega a corresponderse con el número de horas registradas en dos años con valores superiores al 55% ofreciendo de esta forma una idea acerca de la carga de humedad total en cada localización. En cambio, si se atiende por otro lado al patrón mensual, este gradiente queda desdibujado, sobre todo para los meses de verano en el que las cuatro localizaciones exhiben valores similares. Por otro lado, los valores mensuales revelan además dos comportamientos estacionales diferentes y opuestos, uno para la zona de Yungay en la que se observa que los meses más húmedos se corresponden al verano austral, y otro para el resto de localizaciones en las que los meses más húmedos se corresponden con el invierno y principios de otoño austral.

Los valores máximos de HR diarios mensuales exhiben, de forma general, la misma dualidad de comportamiento detectada con los valores medios y reducen a su vez las diferencias diarias entre las áreas de Salar Grande y Lllamará. Atendiendo además a la serie de datos completa de humedad relativa (Fig. 28a), se observa que los picos máximos en estas dos áreas alcanzan diariamente el umbral de deliquesencia durante prácticamente todos los días del año, mientras que en la zona de Yungay raramente se alcanza dicho umbral, hecho que queda bien resumido en los datos sobre el número de horas acumuladas por encima de 75%.

El patrón mensual de mínimas junto con el número de horas acumuladas durante dos años por debajo del 40% de humedad relativa exhibe el nivel de sequedad en cada localización. A tenor de los datos mensuales, pueden reconocerse tres grupos diferentes. El primero, el más "seco", estaría

conformado por las localizaciones de interior, Yungay y Lllamará, cuyos valores mínimos diarios se encuentran acompañados y llegan a descender por debajo del 5% durante los meses de invierno (ver la serie completa Fig. 28a). El segundo grupo recoge la localización de Salar Grande Norte que, a pesar de presentar un comportamiento similar a las localizaciones de interior durante los meses de verano, muestra valores menos reducidos desde Abril hasta Octubre. El último grupo lo describe la localización de Salar Grande Sur cuyos valores mínimos son particularmente relevantes dado que rara vez bajan del umbral de HR en la que comienza a cristalizar la salmuera y formarse la eflorescencia (umbral de eflorescencia $HR < 40\%$).

A diferencia de lo que ocurría con los valores de temperatura, el valor de la oscilación diaria de humedad relativa no resume adecuadamente el comportamiento de la humedad entre cada localización aunque si puede llegar a mostrar el grado de estrés diario de cada área. En este sentido, cabe destacar el comportamiento de la localización de Lllamará, cuyo elevado contraste día-noche presenta valores medios anuales por encima del 60%, llegando en ocasiones al 80%, así como la estabilidad relativa de la localización de Salar Grande Sur.

Tomados en conjunto los valores de temperatura y humedad relativa como principales elementos microclimáticos se realizó un clúster de dos vías con los valores anuales de ambas variables (Fig. 31). Los dendogramas obtenidos, mostraron como las poblaciones más diferentes entre sí fueron Salar Grande Sur y Yungay, mientras que las más próximas entre sí fueron Salar Grande Norte y Lllamará.

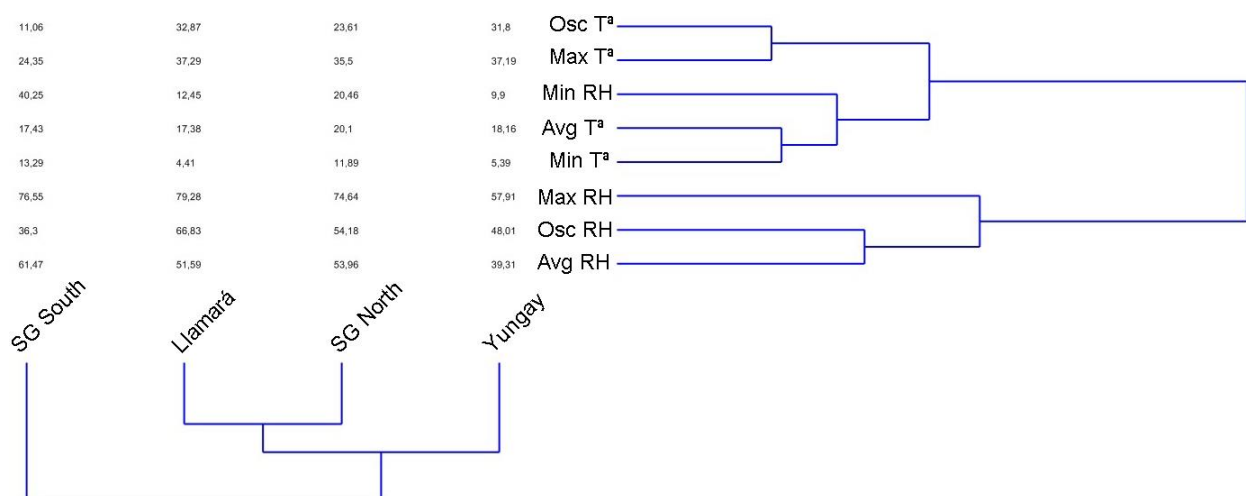


Figura 31. Clúster de dos vías con los valores anuales de temperatura y humedad relativa

Composición química y mineralógica

Los datos semicuantitativos obtenidos por difracción de rayos X de la zona colonizada de los nódulos de sal en todas las localizaciones muestran halita (NaCl) como componente mineral mayoritario (96-99%), presentando fases adicionales minoritarias de yeso, cuarzo y feldespatos tipo plagioclasa. A pesar de la presencia de arcillas tipo illita/mica en la superficie de los nódulos de sal en todas la localizaciones, solo algunas de las muestras analizadas de las áreas de Yungay y Lllamará las presentaban en la zona de colonización. En Yungay, además, se encontraron trazas de anhidrita, que se encuentra presente en el entorno superficial donde se ubica este salar como resultado de las extremas condiciones hiperáridas del área (Octavio Artieda com pers).

Los datos de composición química obtenidos por análisis termogravimétrico y térmico diferencial (tabla 3) avalan los datos obtenidos por difracción de rayos X, mostrando a su vez, el grado de pureza de la sal en cada localización. Los análisis de materia orgánica y elementos nitrogenados no proporcionaron resultados cuantitativos concluyentes al no superar los límites de detección de las técnicas utilizadas.

Tabla 3: Datos de composición química de la zona colonizada de los nódulos de sal en las diferentes localizaciones de estudio.

Análisis elemental (mg/kg)	Yungay	Lllamará	Salar Grande
Sodio	331,23	357,56	340,92
Calcio	4,8844	2,8678	1,0161
Potasio	0,12139	0,09003	0,02936
Magnesio	0,00857	0,01632	0,00053
Cobre	0,00035	nd	nd
Hierro	0,00038	0,00069	0,0003
Cloruro	580,5	591,2	598,1
Sulfatos	13,3	10,27	2,962
Fosfatos	0,0225	0,0314	0,0217
Materia Orgánica (%)	1,67	fm	fm
INSOLUBLES (%)	2,972	0,392	0,578

nd: no detectado

fm: faltó material

Porosidad de los nódulos de sal

Como se observa en la figuras 32a y 32b, los nódulos de sal están conformados por cristales de cloruro sódico que en su conjunto revelan una estructura porosa policristalina de aspecto granular a macroescala. A este nivel de escala, a su vez, se observó que los nódulos presentaban diferencias entre la estructura de la parte superficial de los nódulos y la estructura interna, más

acentuada en los nódulos de Yungay y Llamará. Una primera observación en detalle a nivel microscópico (Fig. 32c y 32d) muestra como estos microcristales presentan tamaños variables entre 10-100 μm cuyos bordes muestran efectos de disolución en los que han desaparecido las formas cúbicas o hexagonales de la cristalización primaria. Los cristales agregados se encuentran aparentemente *cementados* entre sí por una salmuera (véase estudio de microhábitat por LT-SEM) y exhiben numerosos espacios entre ellos dejando huecos o poros de tamaño y forma variables entre los 5 y 50 μm . Los agregados de microorganismos se encuentran en estos poros o embebidos en la salmuera.

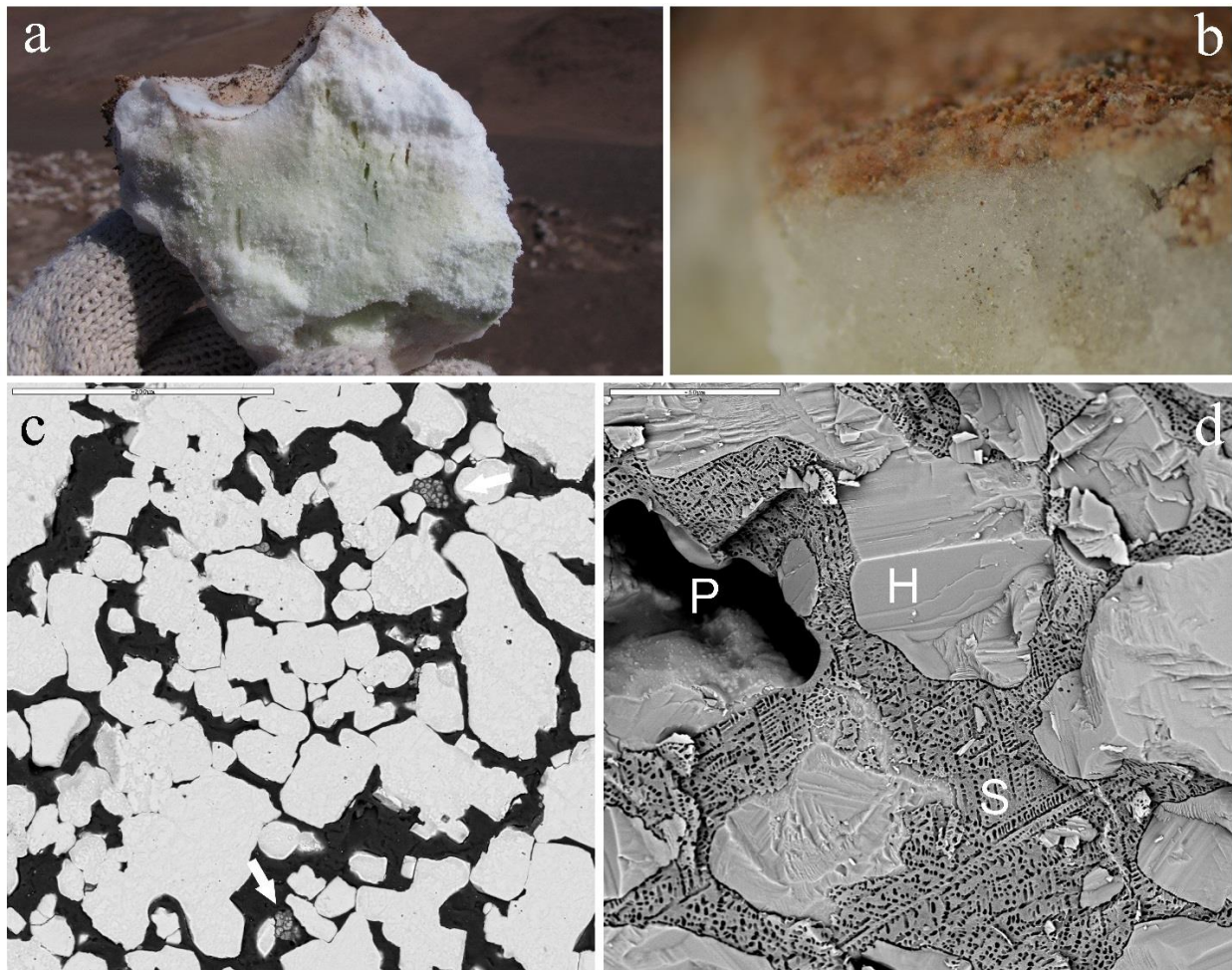


Figura 32: Aspectos de la porosidad de los nódulos de sal. a) Fragmento de nódulo de Salar Grande Norte. b) Detalle de la superficie e interior del nódulo. c) Micrografía de la estructura interna de los nódulos de sal obtenida por SEM-BSE (cedida por Dr Wierzchos. Descripción de la técnica en Wierzchos & Ascaso, 1994). Barra 200 μm . En gris los cristales de halita que muestran signos de disolución parcial. En negro los espacios entre cristales, Las flechas blancas muestran agregados de microorganismos. d) Micrografía obtenida por LT-SEM. Barra 20 μm . (H) cristales de NaCl, (S) salmuera (véase estudio por LT-SEM para su justificación), (P) poro con aire.

Para establecer un estudio comparativo de la porosidad de los nódulos de sal procedentes de las cuatro localizaciones en estudio se utilizó la porosimetría de mercurio para analizar los valores de la porosidad conectada tanto en la zona superficial del nódulo como en la zona de colonización. Los datos obtenidos se encuentran resumidos en la figura 33 que muestra, por un lado, las curvas diferenciales obtenidas durante el análisis a fin de reflejar de forma cualitativa la distribución del tamaño de poro más frecuente en cada localización. Por otro lado, y de forma cuantitativa, se expresan las diferencias netas entre localizaciones y zonas del nódulo en forma de porosidad total media (%) cuyos datos se extrajeron al final del análisis asumiendo que los diferentes poros responden a un modelo cilíndrico.

Como se observa en los datos, de forma general todos los nódulos comparten una estructura común, donde la porción más externa de cada nódulo presenta menor porosidad promedio y un tamaño de poro más pequeño, mientras que la estructura interna es más porosa y cuyos poros presentan un diámetro medio mayor. Esta estructura dual en la cual la parte externa conforma un especie de cascaron que en los casos más extremos, detectados en Yungay y Lllamará, presenta una apariencia superficial claramente cristalina y densa a macroescala (véase esta diferenciación en la Fig. 25a y 25b de material y métodos en el apartado de ambiente lumínico).

Comparando localizaciones, se observan diferencias entre los distintos nódulos. Por un lado, atendiendo a las curvas diferenciales de la zona superficial no se detectan grandes diferencias entre los distintos nódulos aunque los datos cuantitativos obtenidos indican una estructura externa más porosa en Salar Grande pudiendo establecerse dos grupos de muestras, uno con los nódulos pertenecientes a áreas de interior Yungay y Lllamará y otro con los que se sitúan en áreas más próximas a la costa, Salar Grande Sur y Norte. En cambio, los datos obtenidos para las zonas colonizadas, tanto cualitativos como cuantitativos, permiten observar un gradiente entre localizaciones cuyos extremos quedan representados por Yungay, de menor porosidad y poros de menor tamaño, y Salar Grande Sur, con el mayor porcentaje de porosidad promedio y que presenta un tamaño medio de poro casi tres veces mayor que en el resto de las localizaciones.

Cabe mencionar a su vez, que las curvas diferenciales de la zona colonizada de los nódulos procedentes del área de Yungay muestran de forma marcada un conjunto de poros de muy reducido tamaño (nanoporos) menos evidente en nódulos procedentes de otras áreas estudiadas.

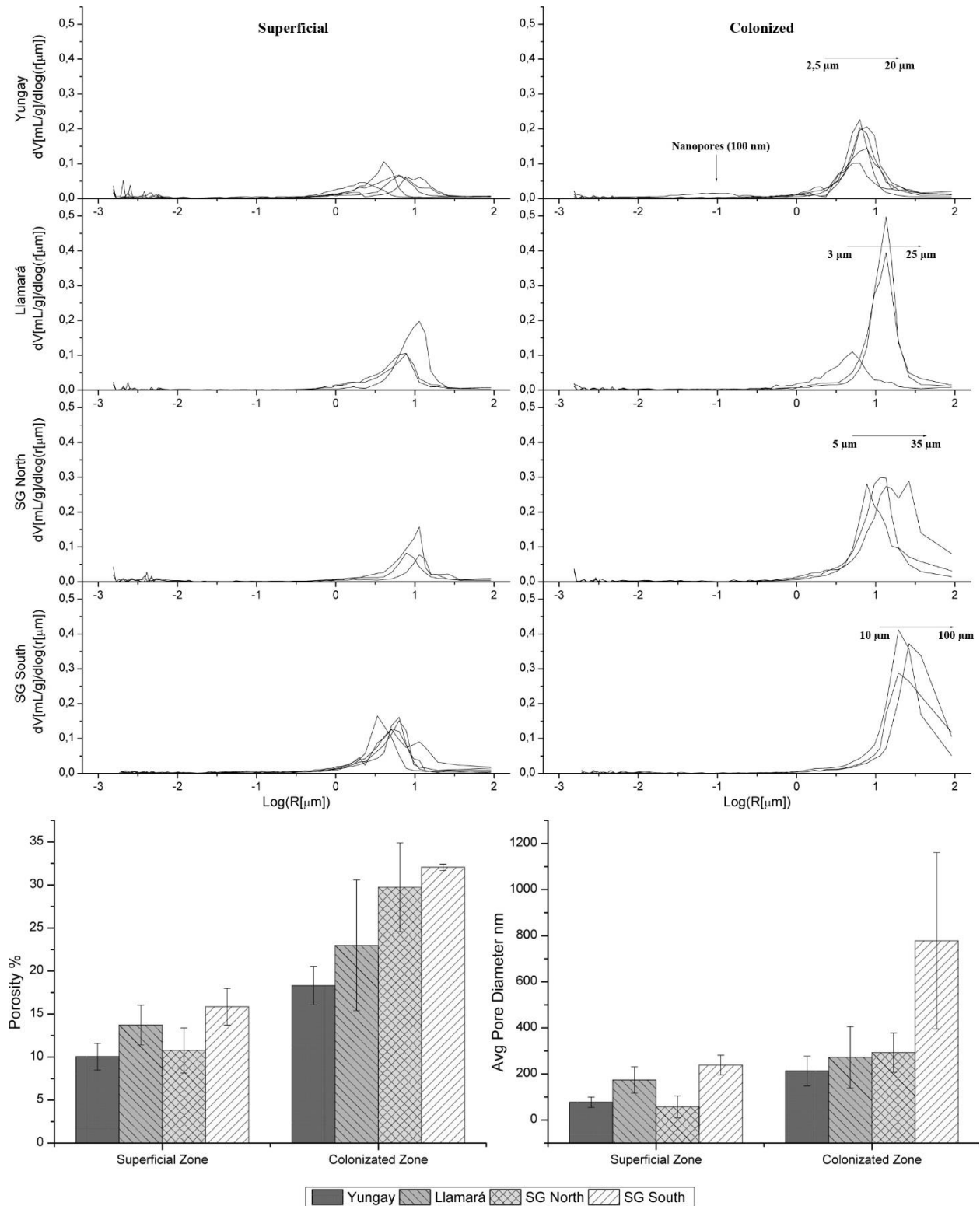


Figura 33: Distribución comparada de tamaño de poro y grado de porosidad de nódulos de halita procedentes de las 4 áreas de estudio. Arriba curvas diferenciales obtenidas durante la inyección de mercurio. A la izquierda, los datos correspondientes a la zona superficial, a la derecha los que se corresponden con la zona colonizada. Abajo gráficos de barras que muestran el porcentaje de porosidad y el tamaño medio de los poros tanto de la zona superficial como la colonizada. El modelo de cálculo asume que los poros son cilíndricos.

Estudio microclimático II: Condiciones microclimáticas internas

Para comprender qué elementos ambientales en el interior de los nódulos facilitan la colonización y supervivencia de comunidades microbianas en un entorno como el desierto de Atacama se llevó a cabo un estudio microclimático del microhábitat en la zona de colonización dividido en tres bloques. Por un lado se realizó un estudio comparado entre nódulos de las dos áreas de muestreo que más diferían entre sí (Fig. 31) respecto a las condiciones microclimáticas externas, Yungay y Salar Grande Sur, en el que se recogen series de datos con los valores registrados durante el periodo comprendido entre el 25 de enero y el 26 de junio de 2010 de los sensores de temperatura, humedad relativa y conductividad eléctrica colocados en el interior de cada nódulo. Estos datos se muestran en comparación con los datos obtenidos por sensores idénticos colocados en la superficie inmediata de cada uno de los nódulos. Por otro lado, en aras de describir cómo y cuándo se producen los fenómenos de captación de agua por parte de los nódulos se desglosaron del conjunto de valores obtenidos para el área de Yungay tres series de datos semanales y una serie diaria dado que esta localización fue la única que mostró fenómenos de desecación y rehidratación. Por último se presentan datos de ensayos llevados a cabo en laboratorio a fin de entender el comportamiento de la luz en el interior de los nódulos.

Temperatura

La figura 34a exhibe en primer lugar los valores medio, máximo y mínimo de temperatura registrados en el interior y el exterior de los nódulos cada día. A modo de síntesis se muestran a su vez los valores de la oscilación térmica diaria registrada en el interior y en el exterior de la eflorescencia (Fig. 34b) así como los valores de la diferencia entre la temperatura interna y externa [$-(T^a \text{ fuera} - T^a \text{ dentro})$] respecto de cada momento registrado en proyección de 24 horas (Fig. 34c).

En función de los valores medios, los resultados obtenidos en el interior no mostraron diferencias respecto a los valores registrados en el exterior. No obstante y en relación a los valores máximos y mínimos diarios si se observaron diferencias, más pronunciadas en la localización de Yungay, cuyo reflejo queda registrado en la gráfica de la oscilación diaria. En función del valor máximo diario se observa como en la localización de Yungay las temperaturas llegaron a alcanzar en el interior del nódulo valores entre 9 y 11 grados por encima de la temperatura del aire (alcanzando casi los 50°C), mientras que en el caso de Salar Grande Sur, el

incremento rara vez superó los 5 grados, siendo el incremento más frecuente en torno a 1 grado (las máximas en el interior no superaron los 35°C). Como se observa en la gráfica de evolución diaria, este incremento tuvo lugar entre las 9:00 y las 17:30 coincidiendo con las horas de luz. Desaparecida la influencia de la luz solar y a razón de los valores mínimos, se observó como en ambas localizaciones la temperatura de interior del nódulo disminuyó por la noche por debajo de la temperatura del aire, entre 3,5 °C en el caso de Yungay y 2,5 °C en la localización de Salar Grande Sur.

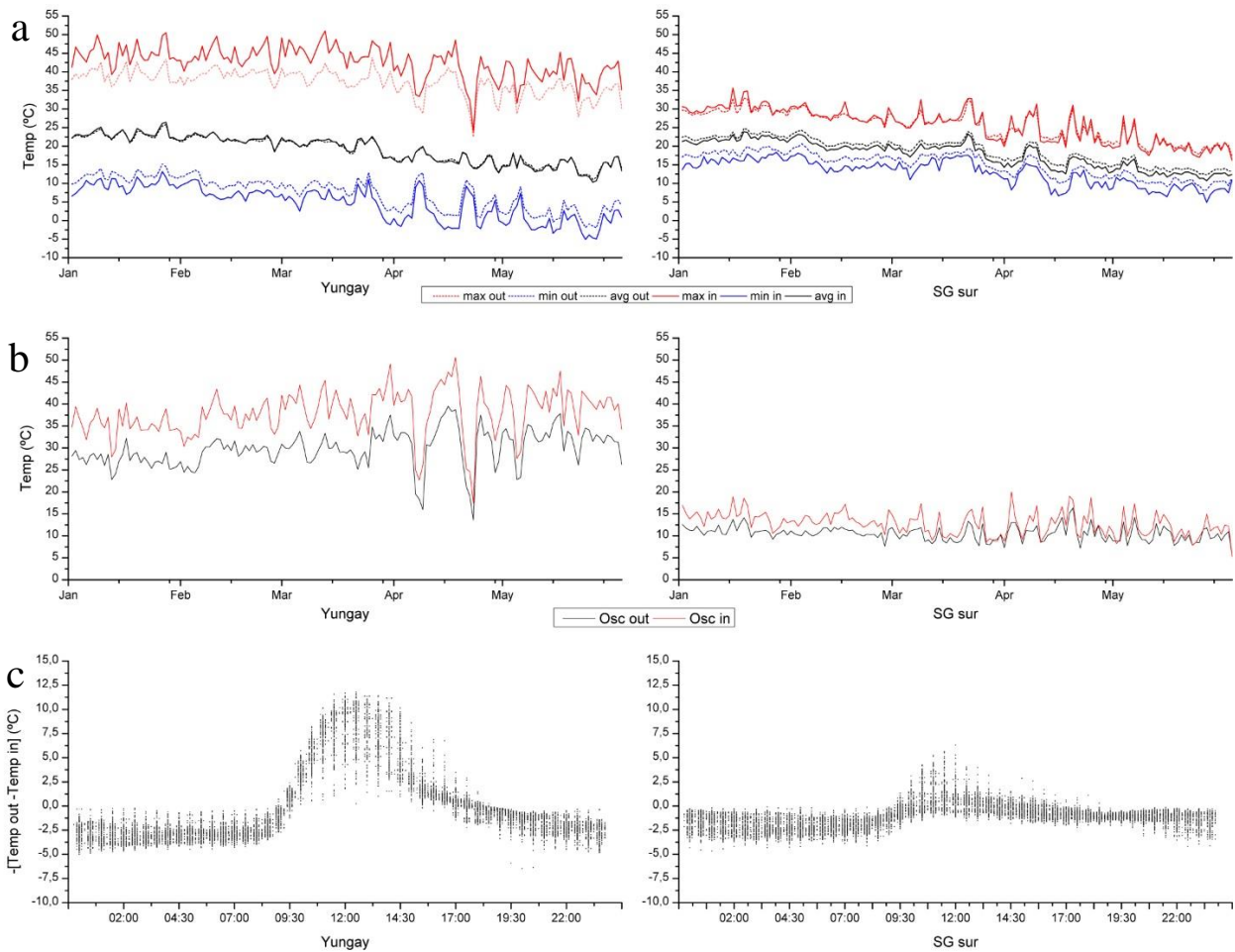


Figura 34: Series de datos de temperatura en el interior de los nódulos de sal obtenidos durante el periodo comprendido entre el 25 de enero y 26 de junio de 2010. En la columna de la izquierda se muestra la localización de Yungay a la derecha Salar Grande sur. A) comparación entre los valores medios, máximos y mínimos diario obtenidos en el interior del nódulo y la masa de aire inmediatamente adyacente a los nódulos en cada localización. B) Valores de la oscilación térmica diaria calculada dentro y fuera de cada nódulo. C) Proyección de 24 horas con los valores de la diferencia calculada de los valores registrados cada media hora de temperatura dentro y fuera del nódulo $[-(T^a \text{ fuera} - T^a \text{ dentro})]$.

Humedad relativa y presencia de agua líquida.

Las condiciones registradas sobre la humedad en el interior de los nódulos en ambas localizaciones se muestran en la figura 35 en forma de series de datos comparados entre la humedad relativa del aire dentro del nódulo y los registrados para la masa de aire a nivel del suelo. A su vez, la presencia de agua líquida (Fig. 35b) se muestra en función de la conductividad eléctrica registrada mediante sensores potencial eléctrico colocados en el interior y en la superficie del nódulo. En este caso solo se presentan los datos de Yungay, debido a que el grupo de sensores colocado en Salar Grande Sur falló en el registro de datos a la semana de su colocación.

En primer lugar, los valores de la humedad relativa mostraron de forma general, tanto en la localización de Yungay como la de Salar Grande Sur (Fig. 35c), un comportamiento totalmente diferenciado entre el interior y el exterior de los nódulos. Ambas localizaciones exhibieron una elevada humedad relativa interna cuyos valores oscilaban en torno al 76.5 % de forma sostenida y durante todo el día, alcanzando valores en los que se produce la deliquesencia y manteniendo el equilibrio metaestable esperado para una salmuera en saturación. En este contexto, comparando las localizaciones entre sí, se observaron diferencias en el comportamiento de la humedad a lo largo del periodo de medidas. Por un lado, los datos registrados en el nódulo de Yungay mostraron varios *eventos secos*, en los que se produce una pérdida de humedad en el interior llegando a equilibrarse con la humedad de la masa de aire en superficie, seguidos posteriormente de eventos de recaptación de humedad. Por otro lado, el nódulo de Salar Grande Sur mantuvo de forma constante los valores a lo largo de todo el registro con independencia del comportamiento de la humedad fuera del nódulo. El análisis pormenorizado de ambas series de datos parece indicar que los *eventos secos* comenzarían cuando la humedad relativa en el exterior no supera a lo largo del día valores por encima del 55% y que los eventos de recaptación de humedad se producen una vez se supera este valor umbral durante uno o dos días consecutivos (véase más adelante). Sumados a los datos de humedad relativa en el interior de los nódulos la serie de datos de conductividad eléctrica para el interior del nódulo de Yungay exhibe como los niveles de humedad relativa por encima del umbral de deliquesencia se corresponden con la presencia de agua líquida dentro del nódulo. Siendo este un proceso fisicoquímico espontáneo, estos datos pueden ser extrapolables a lo que ocurrió en el interior de los nódulos de Salar Grande Sur, entendiendo por tanto que en esta localización la presencia de agua líquida (salmuera) dentro del nódulo tuvo lugar de forma constante sin la aparición de episodios secos.

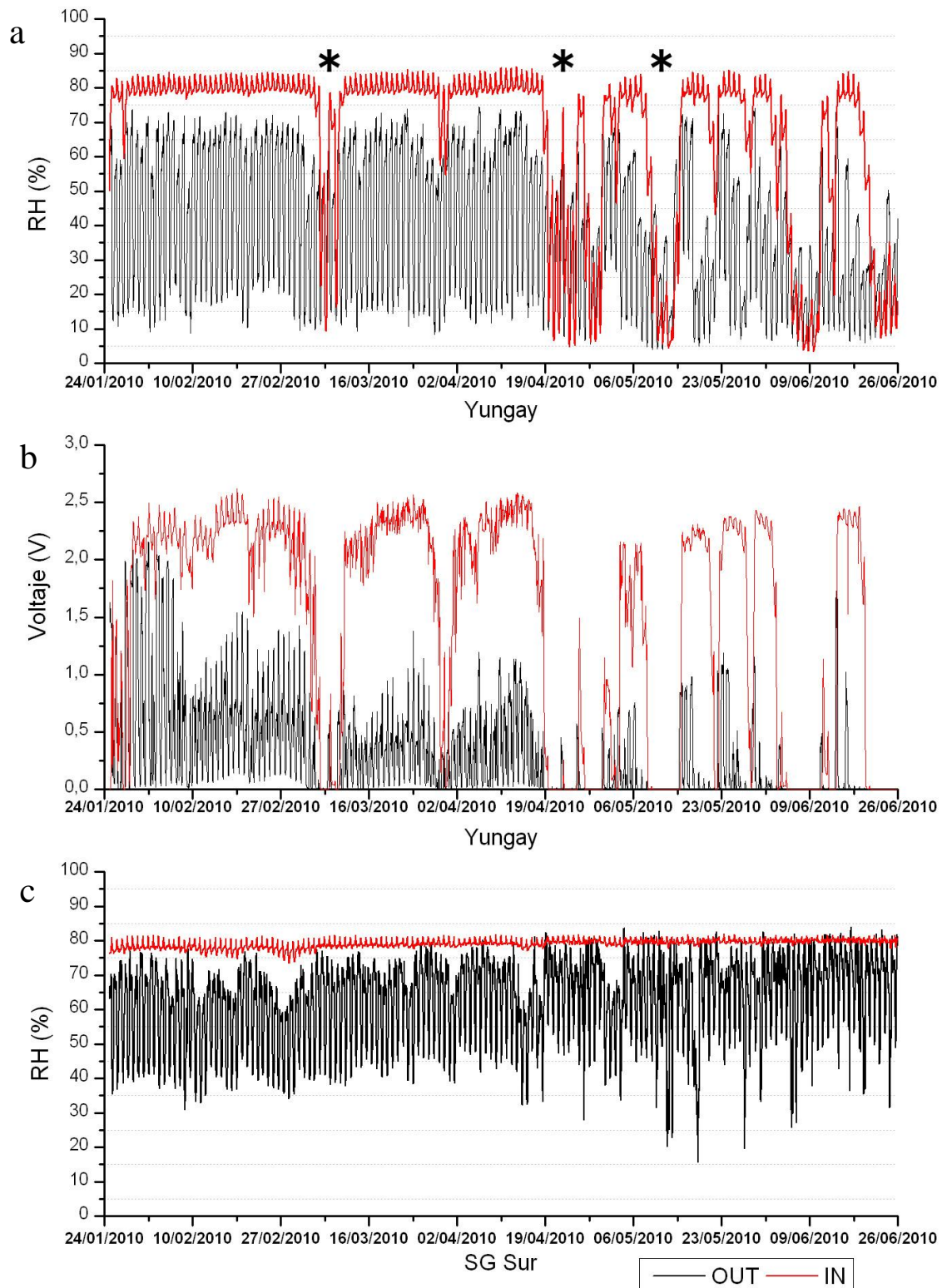


Figura 35: Registro de humedad relativa (RH) y conductividad eléctrica (CE) expresada en voltaje (V) en el interior y exterior de los nódulos en Yungay y Salar Grande Sur. Periodo de 25 de enero a 26 de junio de 2010. Cada pico en la gráfica equivale a un día. a) Humedad relativa dentro y fuera de un nódulo en Yungay. Obsérvese episodios secos (de duración variable entre 1-6 días en este estudio). b) CE dentro y fuera del mismo nódulo de Yungay. Obsérvese correspondencia con los valores de HR. c) Humedad Relativa dentro y fuera de un nódulo en Salar Grande Sur.

A su vez, los datos obtenidos del exterior del nódulo de Yungay mostraron la presencia de agua líquida (salmuera) sobre la superficie cuando la humedad relativa de la masa de aire ascendía por encima del 60% (Fig.36). Cabe señalar en este punto que la presencia de la salmuera en la superficie muestra un comportamiento dual que se explicará en un apartado posterior.



Figura 36: Aspecto nocturno (izq) y diurno (dcha) del área de Salar Grande Sur.

Temperatura de punto de rocío

Obtenidos los valores de temperatura y humedad relativa dentro y fuera de cada nódulo, se calcularon los valores de la temperatura de punto de rocío tanto para el interior de los nódulos como para la masa de aire en el exterior a nivel de suelo. Los valores obtenidos se muestran procesados en la figura 37, que contrapone en primera instancia para cada localización el valor de la temperatura interna del nódulo con el valor de la temperatura de punto de rocío calculada para la masa de aire en la superficie de la roca (Fig. 37a). Estos valores no muestran que la temperatura de los nódulos en ambas localizaciones descienda por debajo del punto de rocío del aire excluyendo de esta forma la deposición de agua por contacto.

Por otro lado, la figura 37b, muestra de forma comparada los valores calculados para la diferencia entre la temperatura interna y la temperatura de punto de rocío de la masa de aire interna del nódulo, frente a los valores de la diferencia entre la temperatura fuera y la temperatura de punto de rocío dentro. Atendiendo únicamente a lo registrado en el interior, los valores obtenidos mostraron que la masa de aire dentro no alcanzó el punto de rocío, por lo que se descartó esta vía como fuente de agua líquida. A su vez, la serie de datos generada para estos valores exhibió de una forma más conspicua la aparición de eventos secos a medida que se incrementa el valor de la diferencia de ambas variables. En cambio, la contraposición de los valores de temperatura de punto de rocío de la masa de aire interna con la temperatura fuera

mostró, durante las horas cercanas al mediodía, valores por debajo del punto de condensación del vapor de agua. Este fenómeno se describirá en detalle en el análisis de la serie diaria de Yungay.

A modo de establecer una aproximación teórica sobre la posible carga de agua en el interior de los nódulos se calculó la humedad absoluta para las masas de aire tanto interna como externa (Fig. 37c). Los resultados obtenidos para la masa de aire a nivel del suelo en Yungay muestran una carga de agua en torno a los 5-8 gramos por metro cúbico de aire (gr/m^3), acorde con los experimentos llevados a cabo por Cáceres y colaboradores (2007), y unos $10 \text{ gr}/\text{m}^3$ en Salar Grande Sur. En cambio, en el interior de los nódulos la carga de agua se elevó hasta los $60 \text{ gr}/\text{m}^3$ en Yungay y entre $20\text{-}15 \text{ gr}/\text{m}^3$ en Salar Grande Sur.

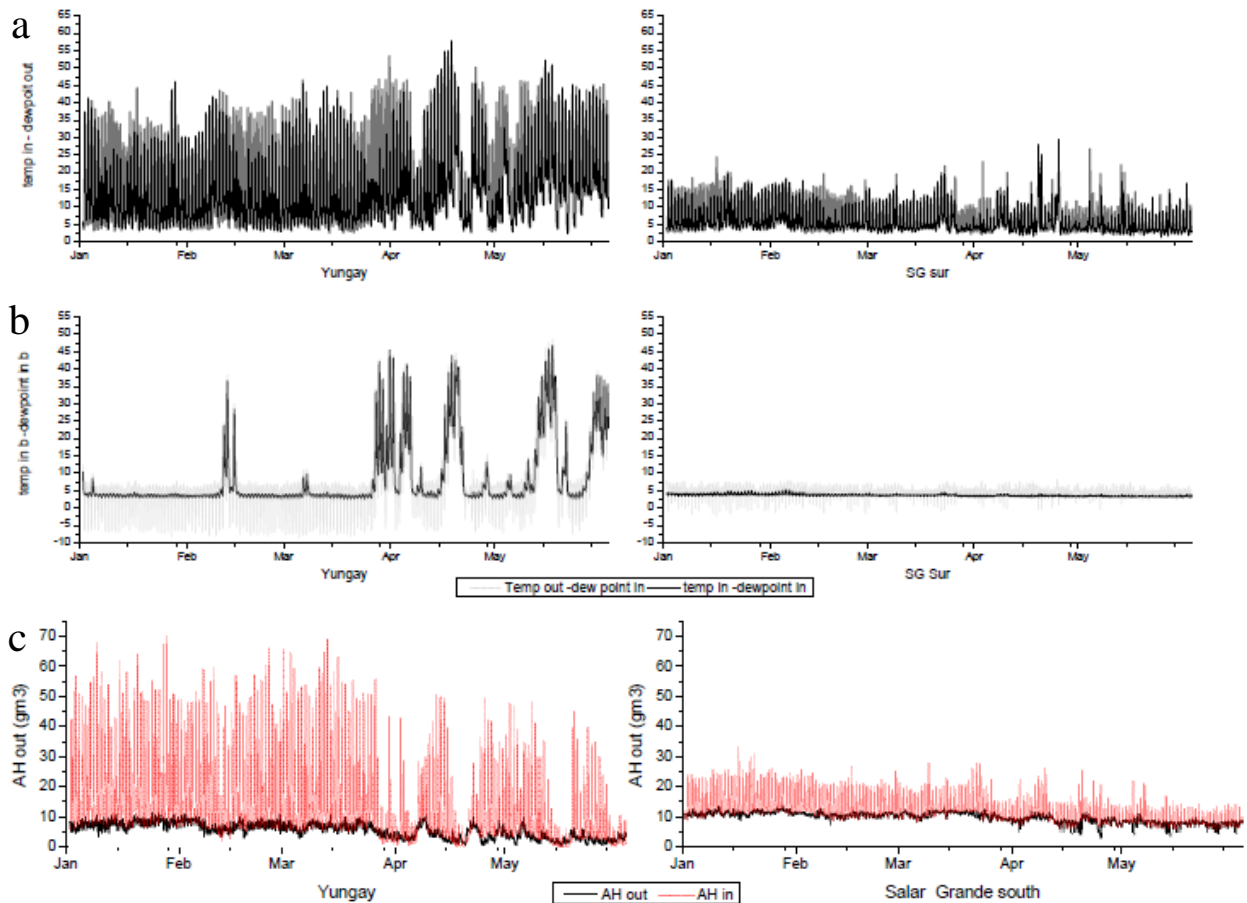


Figura 37: Temperatura del punto de rocío (dewpoint) y humedad absoluta (AH) en Yungay y Salar Grande Sur. Periodo de 25 de enero a 26 de junio de 2010. a) Temperatura interna del nódulo – temperatura punto de rocío de la masa de aire externa. Los valores negativos indicarían deposición por contacto. b) En negro, temperatura interna – temperatura de punto de rocío de la masa de aire interna. Valores en negativo indicarían condensación. Nótese correlación con la aparición de eventos secos. En gris, temperatura externa – temperatura de punto de rocío interna. c) Humedad absoluta en g/m^3 . En negro humedad absoluta a nivel de suelo. En rojo humedad absoluta en el interior de los nódulos.

Eventos secos y húmedos. Caso Yungay

Sobre la serie de datos de Yungay se realizó un estudio detallado a fin de determinar las vías de captación de agua, el comportamiento de esta en los nódulos y las posibles ventanas diarias para realizar la fotosíntesis, dado que de las dos áreas en estudio fue la única donde se registraron en el interior de los nódulos alternancia entre días secos y húmedos.

En primer lugar, de la serie completa de datos microclimáticos se seleccionaron tres eventos secos (marcados con * en Fig 35), de los cuales uno de ellos se muestra en la figura 38a en forma de serie semanal (el resto en anexo IV). La serie semanal describe un ciclo que parte del estado hidratado pasa por un estado de desecación y posterior rehidratación. A fin de una descripción más detallada se eligió una serie de 24 horas que resume e idealiza la dinámica observada en el nódulo (Fig. 38b).

De forma general, en el interior de los nódulos se reprodujo a nivel térmico la regularidad externa fuertemente sujeta a la evolución de la radiación solar. Como contraste esperado con la masa de aire en el exterior del nódulo, el interior mostró un sobrecalentamiento entre las 9:30 de la mañana y las 15:00 del mediodía en torno a los 9°C de media. La temperatura máxima alcanzada en el interior fue 43,4 °C a las 14:00. Pasado el máximo solar el interior del nódulo se equilibró rápidamente con la temperatura externa y a partir de las 19:00 comenzó a enfriarse por debajo de la temperatura del aire llegando a presentar una diferencia entre 2 y 3 grados durante la noche.

En paralelo con la dinámica térmica y con comportamiento opuesto, la humedad relativa en el exterior mostró un incremento durante la noche cuyo máximo se alcanzó antes de la salida del sol (65,5% a las 9:00) y cuyos niveles descendieron rápidamente a partir de las 9:30 (hasta 14,8% a las 17:00). Durante el incremento nocturno externo, el interior del nódulo reflejó un aumento progresivo de la humedad relativa que, durante aquellas noches en las que la humedad relativa externa superó el 55-60%, continuó hasta mediodía desligándose del comportamiento exterior. Este incremento interno alcanzó el máximo ligeramente por encima del 75 % durante las 10:00 hasta aproximadamente las 16:00 donde exhibieron un descenso suave hasta el 70%. Los niveles internos se mantuvieron de un día para otro en aquellos casos en los que durante la noche siguiente la humedad relativa externa volvió a ascender por encima del 55-60%, en caso contrario se observó un evento de desecación interna del nódulo en el cual los niveles de humedad relativa desciende de forma paralela a los niveles en el exterior.

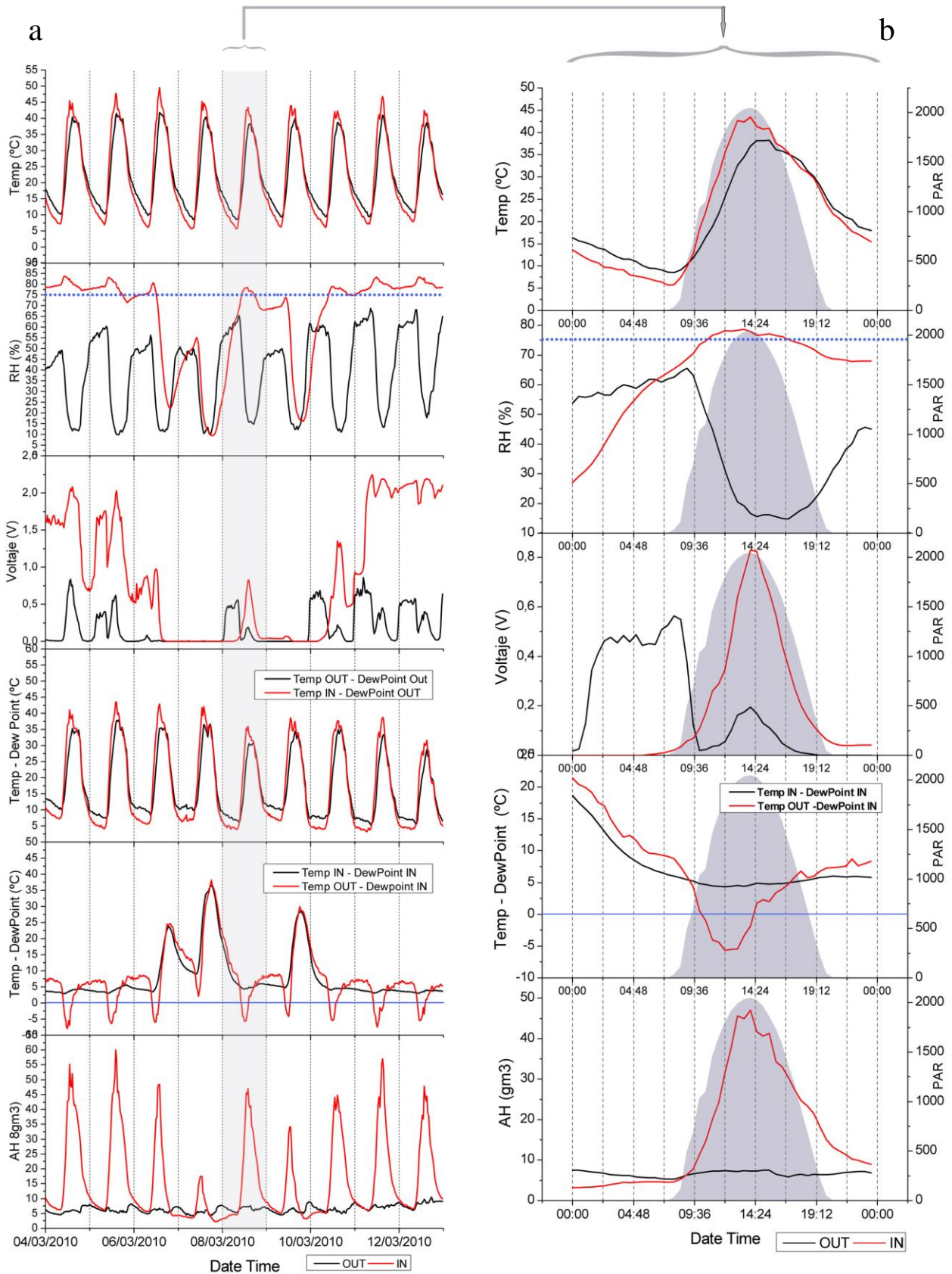


Figura 38: Eventos secos en Yungay y captación de agua por el nódulo. a) Serie semanal (4 de marzo de 2010 a 13 de marzo de 2010). b) Serie diaria (8 marzo de 2010). En ambas: línea punteada en azul se corresponde con la HR de deliquesencia para el NaCl. Por debajo de la línea continua azul se alcanza punto de rocío.

Los valores de conductividad eléctrica se acompañan con los incrementos en humedad relativa. En la superficie del nódulo durante los incrementos de humedad relativa nocturnos por encima del 55% se registró, en todos los casos, paso de corriente aunque en unos cuantos de ellos los valores obtenidos fueron de muy baja intensidad. En el interior del nódulo sólo se observó la presencia de agua líquida cuando los valores de humedad relativa internos se encontraron en torno a los valores de deliquesencia. Cabe mencionar que durante los eventos en los que se registró agua líquida en forma de salmuera (electrolitos) en el interior del nódulo, coincidiendo con el máximo térmico a mediodía, se observó un segundo incremento en el registro de CE en la superficie del nódulo. Este segundo registro, que acontece durante las horas que en las que tiene lugar el mínimo de humedad relativa en el exterior, se entiende que se produce por la salida de la salmuera del interior al exterior del nódulo, hecho que queda registrado durante toda la serie de datos en forma de dobles picos, en algunas ocasiones superpuestos. La figura 39 muestra las nuevas eflorescencias salinas generadas en superficie a consecuencia de este proceso.



Figura 39: Eflorescencias salinas sobre los nódulos.

Los valores de humedad absoluta no mostraron cambios en los datos calculados para el exterior del nódulo, manteniendo valores relativamente constantes en torno a los $5 \pm 2 \text{ gr/m}^3$ a lo largo de todo el día con independencia de los cambios de temperatura de la masa de aire a nivel del suelo. En cambio los valores dentro del nódulo durante los eventos de rehidratación mostraron una evolución relativamente paralela a los datos de humedad relativa y CE en el interior, presentando un fuerte incremento a medida que aumentó la temperatura dentro del nódulo durante las horas de luz, aunque en ningún caso se observó que los niveles se mantuvieran de un día para otro. Los máximos valores obtenidos se produjeron en torno a las 14:00 y oscilaban alrededor de los $40\text{-}45 \text{ gr/m}^3$ decayendo rápidamente a medida que descendió la temperatura dentro del nódulo. Durante los eventos secos continuaron presentándose incrementos en la humedad absoluta aunque de menor intensidad con picos máximos calculados entre los 10 y

15 gr/m³. Estos datos parecen mostrar que la dinámica de la humedad absoluta dentro se ajusta más a los ritmos marcados por la pauta térmica.

Por otro lado, las series semanales (Fig. 38 y anexo IV) muestran a su vez los cálculos de la diferencia entre las temperaturas de cada una de las masas de aire, tanto la interna como la externa, frente a valores de la temperatura de punto de rocío de la masa de aire externa. Como se describe anteriormente los resultados obtenidos no mostraron en ningún momento eventos de condensación de agua exhibiendo un comportamiento correlacionado negativamente con los valores de humedad relativa del aire fuera del nódulo (por claridad expositiva estos datos no se muestran en la serie diaria).

En cambio, el cálculo cruzado de la temperatura interna y externa con los valores de la temperatura de punto de rocío de la masa de aire dentro del nódulo mostraron dinámicas diferentes (se muestran en Fig. 38b). Por un lado, los valores de la diferencia entre la temperatura interna del nódulo con los valores calculados para su temperatura de rocío exhibieron durante los eventos húmedos un equilibrio a lo largo de todo el día manteniéndose la temperatura interna del nódulo en torno a los 3 °C por encima de la temperatura de punto de rocío calculada. Durante los eventos secos esta diferencia se incrementa y su dinámica se asemeja al comportamiento descrito para la masa de aire en el exterior. Por otro lado, la diferencia entre la temperatura de la masa de aire a nivel del suelo frente a la temperatura de punto de rocío de la masa de aire en el interior del nódulo describió un comportamiento similar a la dinámica anteriormente citada salvo en los eventos húmedos durante las horas de luz en las que la roca presenta mayor temperatura que la masa de aire externa. Durante estos eventos se observó como la temperatura descendía por debajo del punto de condensación del vapor de agua entre las 9:30 y las 14:20 presentando un valor máximo de dicha diferencia en torno a los -5°C coincidiendo con el máximo de temperatura en el interior del nódulo.

Ambiente lumínico dentro de los nódulos

Previo a los ensayos realizados para el estudio cualitativo se observó que según el tipo de preparación de la muestra los resultados en la transmisión de luz diferían. De este modo, los primeros ensayos con preparaciones de láminas finas de diferente grosor (datos no presentados) mostraron menor transmisividad (menor número de cuentas registradas en el sensor de la cámara CCD) que los ensayos realizados con nódulos íntegros (en este estudio). Este comportamiento

indicaría que los nódulos completos actúan como colectores de luz capaces de dirigir y reflejar la luz en todas direcciones dentro del nódulo.

En relación a la calidad de luz medida dentro de los nódulos, el ensayo realizado a diferentes profundidades de un nódulo seco de Yungay mostró de forma general una importante reducción en la transmisión del espectro de luz en todas las longitudes de onda (Fig. 40a), más acentuada en la región del espectro que se corresponde con la radiación UV-A y UV-B. Dentro del espectro visible se observa que la transmisión máxima se alcanza en longitudes de onda comprendidas entre los 600-700nm coincidiendo con los picos de absorción máxima de ficocianinas ($\approx 620\text{nm}$) y la clorofila a (680nm). La gráfica de luz transmitida (Fig. 40a) muestra como el porcentaje de luz detectada decrece a medida que se profundiza en el nódulo, llegando a extinguirse, en el caso de Yungay, por debajo de los 14,43 mm de profundidad (aunque terminado el ensayo y fracturado el nódulo se observó abundante colonización por debajo de esta profundidad entre los 6-7 mm y los 16 mm, véase Fig. 25 en Mat & Met). Los resultados obtenidos para el nódulo de Yungay no pudieron ser comparados con un ensayo similar en un nódulo de Salar Grande Sur, puesto que los resultados obtenidos se mostraron no concluyentes dado que una vez fracturada la roca su forma no permitió evaluar con precisión la distancia recorrida por la luz (aunque los datos sugerirían que la profundidad a la que se detecta luz podría ser mayor que en los nódulos de Yungay, en torno a unos 25mm).

Los ensayos para calcular la cantidad de luz PAR que se alcanza a la altura de la colonización realizados sobre láminas finas, 6mm en el caso de Yungay y 9 mm en el caso de SGS (Fig. 40b), para mostraron en primer lugar un incremento notable en la transmisividad cuando las mismas láminas se encontraban en un estado húmedo frente a un estado seco e iluminadas a la máxima intensidad de la lámpara ($2386,75 \pm 80,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} = \mu\text{E}$). Para el caso de Yungay este incremento algo más del doble (PAR en seco = $136,46 \pm 3,94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vs PAR húmedo = $309,53 \pm 9,79 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y para el caso de Salar Grande Sur casi el triple (PAR en seco = $45,92 \pm 1,95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vs PAR húmedo = $131,79 \pm 5,82 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A tenor de estos datos, y entendiendo que los eventos fotosintéticos pueden ser más probables cuando los nódulos presentan agua líquida (salmuera), se realizaron mediciones de la cantidad de luz transmitida con las láminas humedecidas a intensidades crecientes de luz PAR simulando el cambio de intensidad que se produce desde la salida del Sol hasta mediodía. En este ensayo (Fig. 40c), los datos obtenidos mostraron en ambos casos una relación lineal de la cantidad de luz registrada a la profundidad de colonización frente al total de radiación incidente. Bajo todas las

intensidades de iluminación ($188,57 \pm 4,82$; $662,31 \pm 16,72$; $1316,95 \pm 44,98$; $2169,08 \pm 71,36$; $2386,75 \pm 80,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el nódulo de Yungay se registró en torno a un 11-12 % de la radiación PAR incidente mientras que en SGS se registró entre un 5-6% del total de radiación incidente.

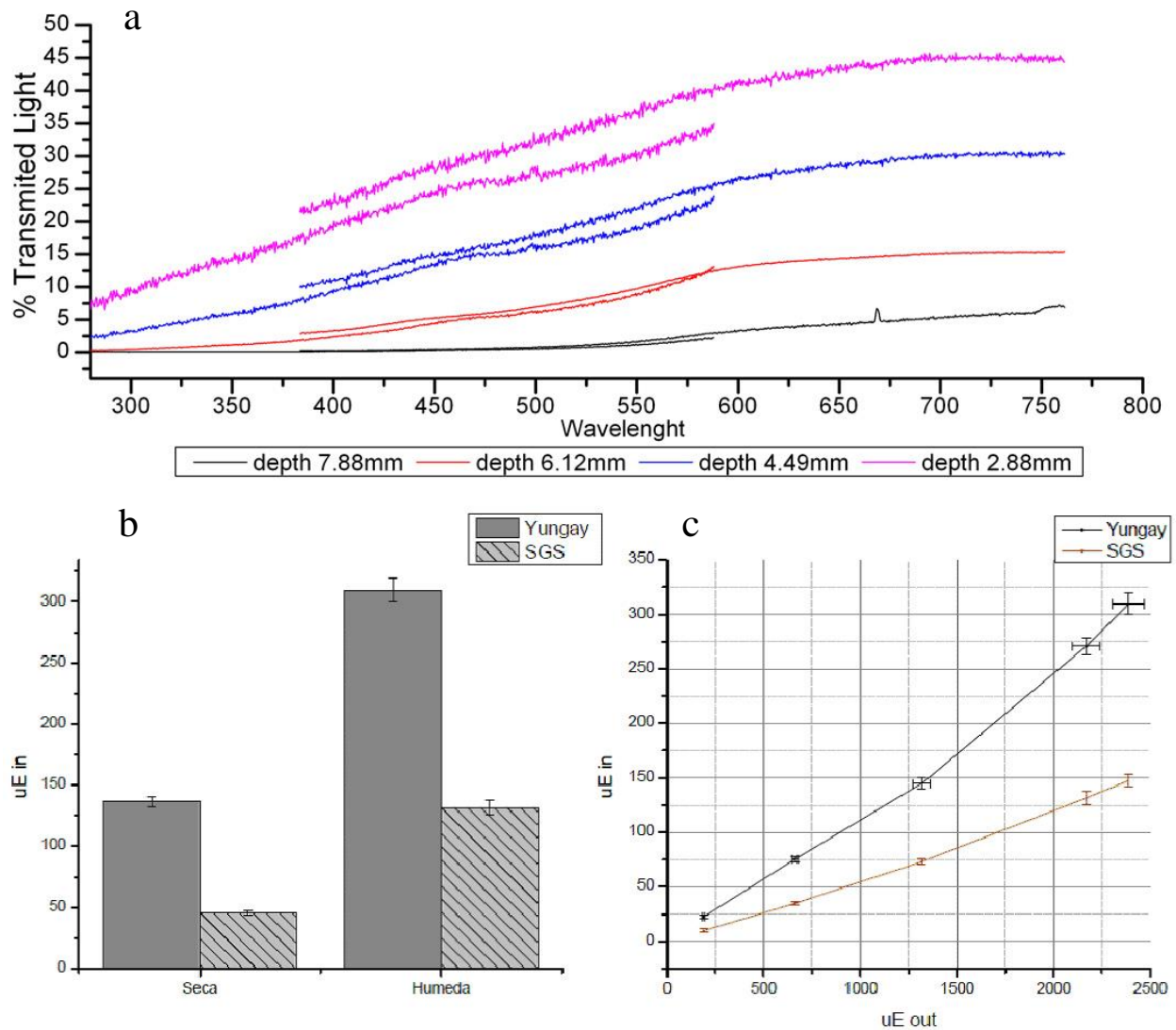


Figura 40: Estudio del ambiente lumínico en el interior de los nódulos. A) Evaluación cualitativa del espectro de luz registrado a distintas profundidades del nódulo. Las dos líneas que se muestran en cada profundidad se corresponden con los espectros de cada una de las lámparas (espectro ultravioleta y espectro visible e infrarrojo cercano. No se detectó transmisión de luz por debajo 14,43 mm. B) A la izquierda, intensidad de luz PAR detectada en láminas finas de nódulos de Yungay y SGS (6 y 9 mm de espesor respectivamente) húmedas y secas e iluminadas a una intensidad PAR de $2386,75 \pm 80,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} = \mu\text{E}$. A la derecha, intensidad PAR detectada al iluminar las láminas finas húmedas con intensidades crecientes de PAR ($188,57 \pm 4,82$; $662,31 \pm 16,72$; $1316,95 \pm 44,98$; $2169,08 \pm 71,36$; $2386,75 \pm 80,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Estudio por Microscopia de la colonización de los nódulos de sal.

Microscopía estereoscópica y microscopía óptica de campo claro (MOC).

Para realizar una primera descripción de la colonización microbiana de los nódulos de sal se realizó un análisis mediante microscopia estereoscópica y microscopia óptica de campo claro de secciones finas (Fig. 41 y 42). El análisis mediante microscopía estereoscópica (Fig. 41) mostró que los patrones macroscópicos de colonización de los nódulos descritos en diferentes áreas de muestreo (Fig. 22 en material y métodos) son consecuencia de la disposición espacial a microescala de pequeños agregados celulares de tamaño y color variable en el interior de los nódulos de sal. En la colonización en banda presente en Yungay y Lllamará (Fig. 22b y 22d, 41a, 41b y 41f), los agregados se encontraron próximos entre sí y mayoritariamente concentrados en torno a la zona de cambio en la textura porosa de los nódulos descrita en la sección de porosimetría para estas áreas. En cambio, en la colonización en volumen presente en las posiciones internas de los nódulos de Salar Grande Norte y Sur (Fig. 22c y 22d; Fig. 41c, 41d y 41f), los agregados se sitúan muy distantes entre sí ocupando amplias regiones textural y composicionalmente homogéneas (sin mezcla con arcillas, aunque con frecuencia aparecen próximas a estas). En la colonización en banda superficial de Salar Grande Sur (Fig. 41e) los agregados celulares presentaban mayor grado de compactación y se situaban en una zona de mezcla con minerales arcillosos superficiales. El análisis de las secciones finas (Fig. 42) mostró que estos agregados celulares se disponen en el interior de los nódulos de halita ocupando espacios entre los cristales de sal. En estos espacios las células pueden presentarse en agrupaciones irregulares (agregados) (Fig. 42a y 42b), en forma de células individuales que no conforman agregados (Fig. 42c) o formando agrupaciones lineales (Fig. 42d).

Al comparar el tamaño medio de los agregados, que oscilaba entre los 10 a 100 μm , se detectó un gradiente entre las distintas áreas de muestreo. En función de su frecuencia, los agregados más pequeños fueron más abundantes en Yungay, aumentando en tamaño promedio en Lllamará, luego en Salar Grande Norte y finalmente en Salar Grande Sur, donde los agregados más frecuentes estaban compuestos por cientos de células, los cuales, en algunos casos, parecían fusionados a otros agregados. A su vez, y en apariencia correlacionado con este mismo gradiente, se observaron diferencias en el grado de pigmentación de los agregados que presentaron un color entre el negro y el marrón oscuro en Yungay disminuyendo hasta un color verde muy claro en la colonización en volumen de Salar Grande Sur, reproduciendo de esta forma el color observado a macroescala (negro-marrón oscuro-amarillo-verde oscuro-verde claro).

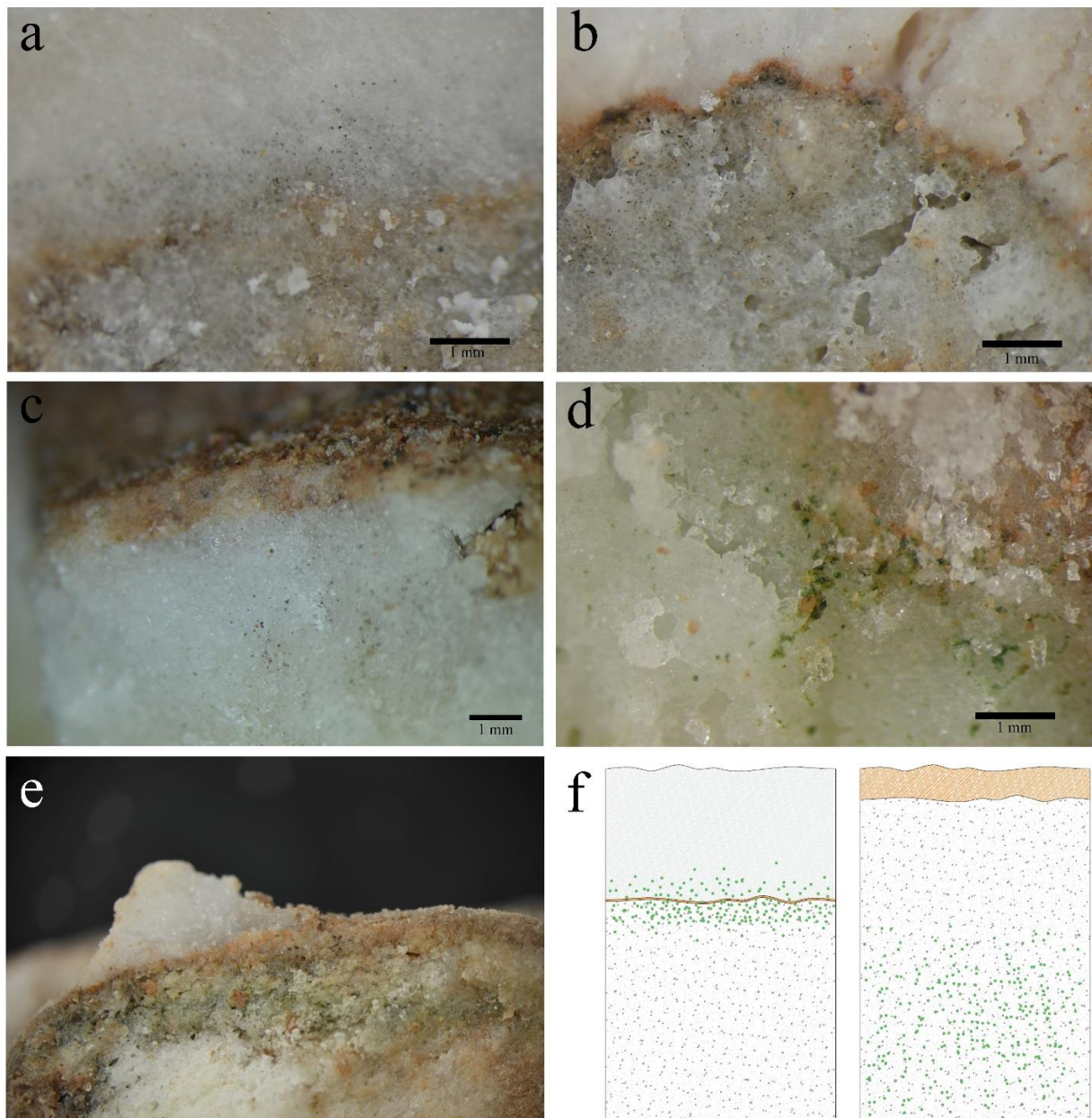


Figura 41: Micrografías obtenidas por microscopía estereoscópica de fragmentos de diferentes nódulos de sal colonizados y recogidos en cada área de muestreo. Colonización en banda a) Yungay y b) Lllamará. Los puntos de color oscuro se corresponden con agregados de microorganismos. La zona de colonización en este caso se concentra en torno a la interfase entre distintas estructuras de los nódulos. De arriba a abajo: superficie, estructura compacta (poco porosa), línea de acumulación de minerales arcillosos, estructura porosa. Colonización en volumen. c) Salar Grande Norte y d) Salar Grande Sur. Obsérvese como la colonización se dispone en amplias zonas de sal pura porosa. En c) de arriba a abajo: superficie, capa de sales y minerales arcillosos densamente mezclados, halita pura porosa. e) Colonización en banda superficial de Salar Grande Sur, los agregados se encuentran mezclado con sales, minerales arcillosos y posiblemente otros detritos arrastrados por el viento. f) Esquema idealizado de los tipos de colonización: en Banda (izq), en Volumen (dcha). Los puntos verdes se corresponden con los agregados de microorganismos, las bandas marrones con minerales arcillosos.

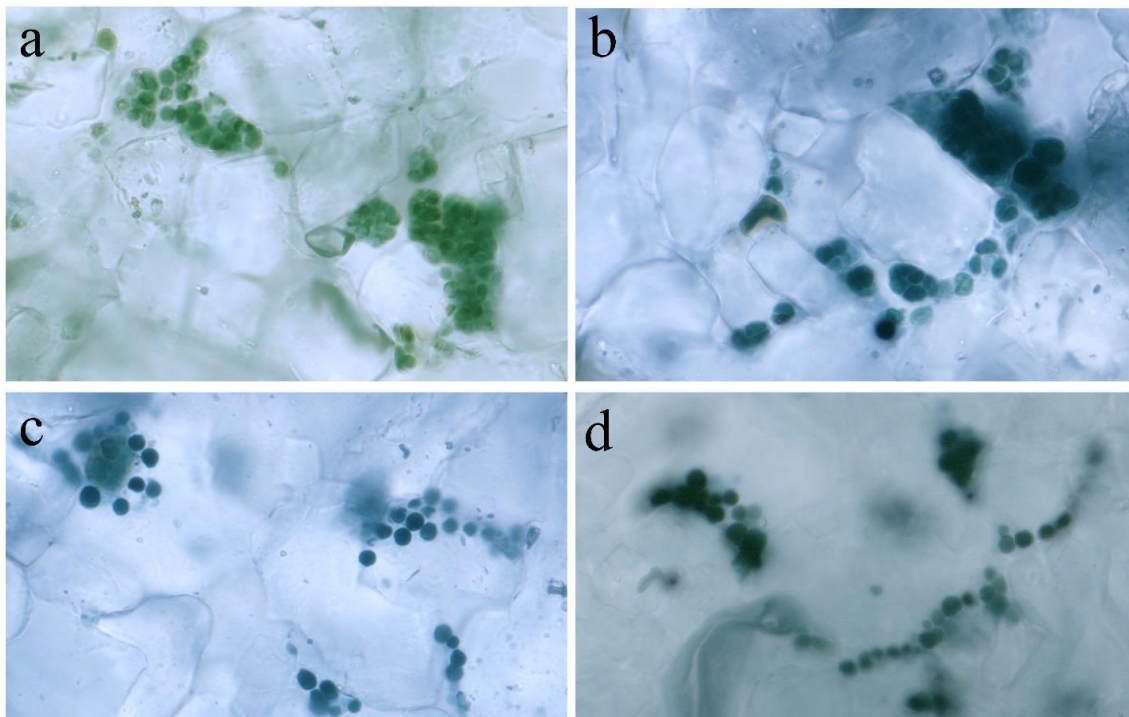


Figura 42: Secciones finas de nódulos de halita. Microscopía de campo claro. a) y b) agrupaciones irregulares de agregados entre cristales de sal. c) agrupaciones de células individuales. d) agrupaciones lineales.

La visualización al microscopio óptico de campo claro y con el microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) de preparaciones obtenidas mediante la disolución de los nódulos de halita reveló, en las cuatro áreas de estudio, que los agregados se componían de cianobacterias que exhibían una cubierta externa de gran grosor que presentaba pigmentación oscura (sobre todo en las localizaciones de Yungay y Lllamará) y que mostraban concordancias morfológicas con morfotipos del género *Chroococcidiopsis* (Fig. 43). En este sentido, la variación morfológica observada en las muestras fue entendida como diferentes estadios de su posible ciclo vital (Fig. 43a y véase descripción en Fig. 44), desde células individuales esféricas u ovoides de entre 3 y 5 μm (Fig. 43c), a grandes aglomerados celulares que podían alcanzar los 100 μm de diámetro (posiblemente formas coloniales) (Fig. 43b). Aunque estas distintas morfologías se encontraban presentes en diferentes muestras correspondientes a cada área de muestreo, se observó un diferente predominio de ellas en cada localidad. Las morfologías más frecuentes en las dos localidades de Salar Grande fueron los grandes aglomerados celulares (Fig. 43b y 43c), mientras que las formas más comunes en Yungay y Lllamará fueron agrupaciones de pocas células (Fig. 43d y 43e). Cabe mencionar a su vez, que en todas las áreas de estudio las cianobacterias aparecían acompañadas de otros microorganismos heterótrofos (Fig. 43f) y que en el caso de Salar Grande, tanto Norte como Sur, se presenta además un alga unicelular que ha sido descrita en Robinson y colaboradores (2015) (Fig. 43c).

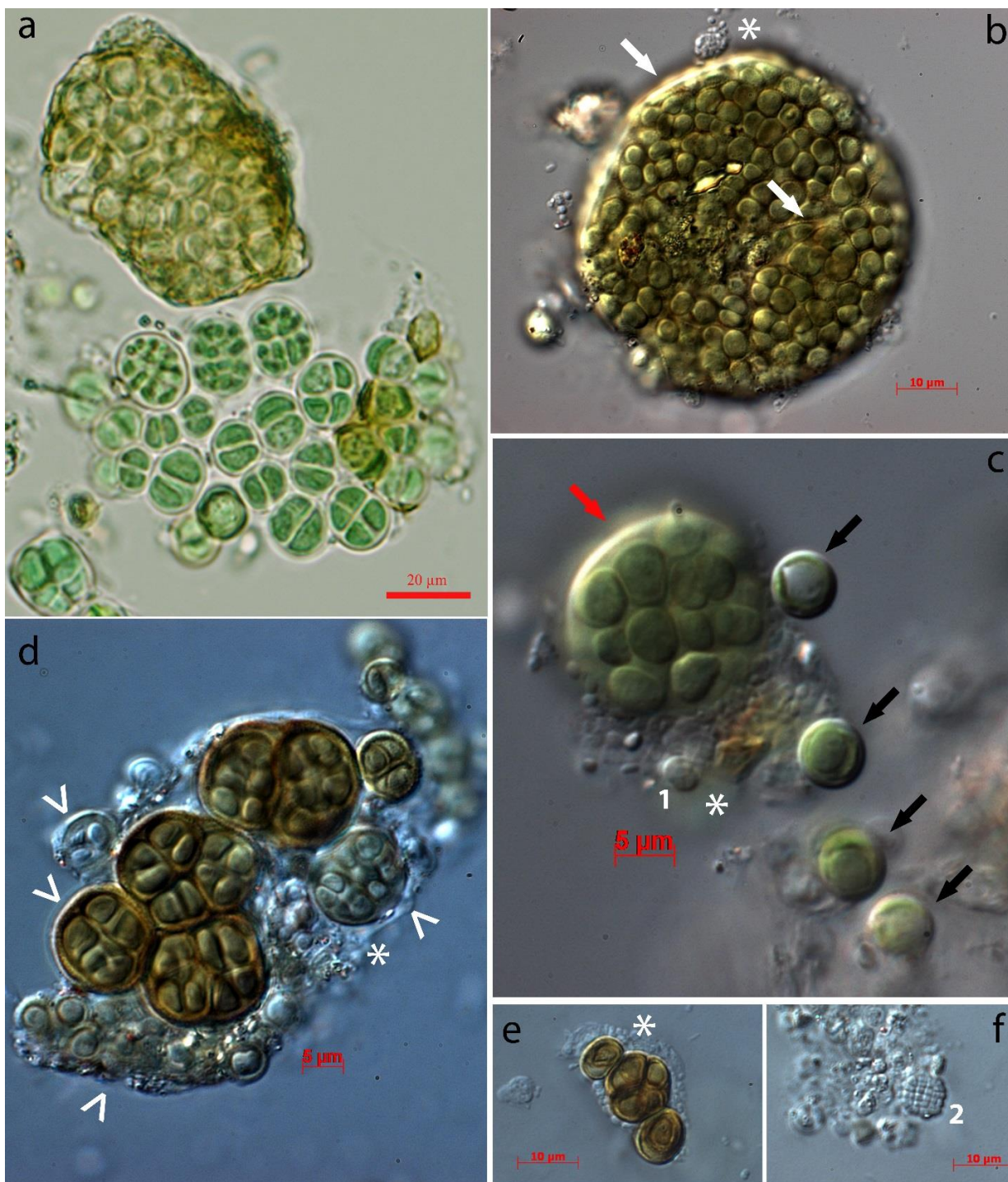


Figura 43: Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro y microscopía de contraste de interferencia diferencial. a) Micrografía que muestra diferentes estadios del ciclo vital de la cianobacteria. Véase descripción continuación en Fig. 44. b) Forma colonial de Salar Grande Sur. Las flechas blancas muestran la cubierta exterior colonial y la cubierta formada por células en el interior. c) Agregado cianobacterias de pequeño tamaño en Salar Grande Norte. Flecha roja = cianobacterias; Flechas negras = alga. d) Agregado en Llamará. Nótese el grosor de las cubiertas. Signo > indica cianobacterias en distintos estadios de decoloración. e) Formas individuales y colonias pequeñas en Yungay. f) Microorganismos heterótrofos presentes en nódulos de Yungay. En todas: (*) = microorganismos heterótrofos. La numeración indica morfologías reconocidas entre los organismos asociados. Nota: las imágenes tienen resolución suficiente para su ampliación en la copia digital.

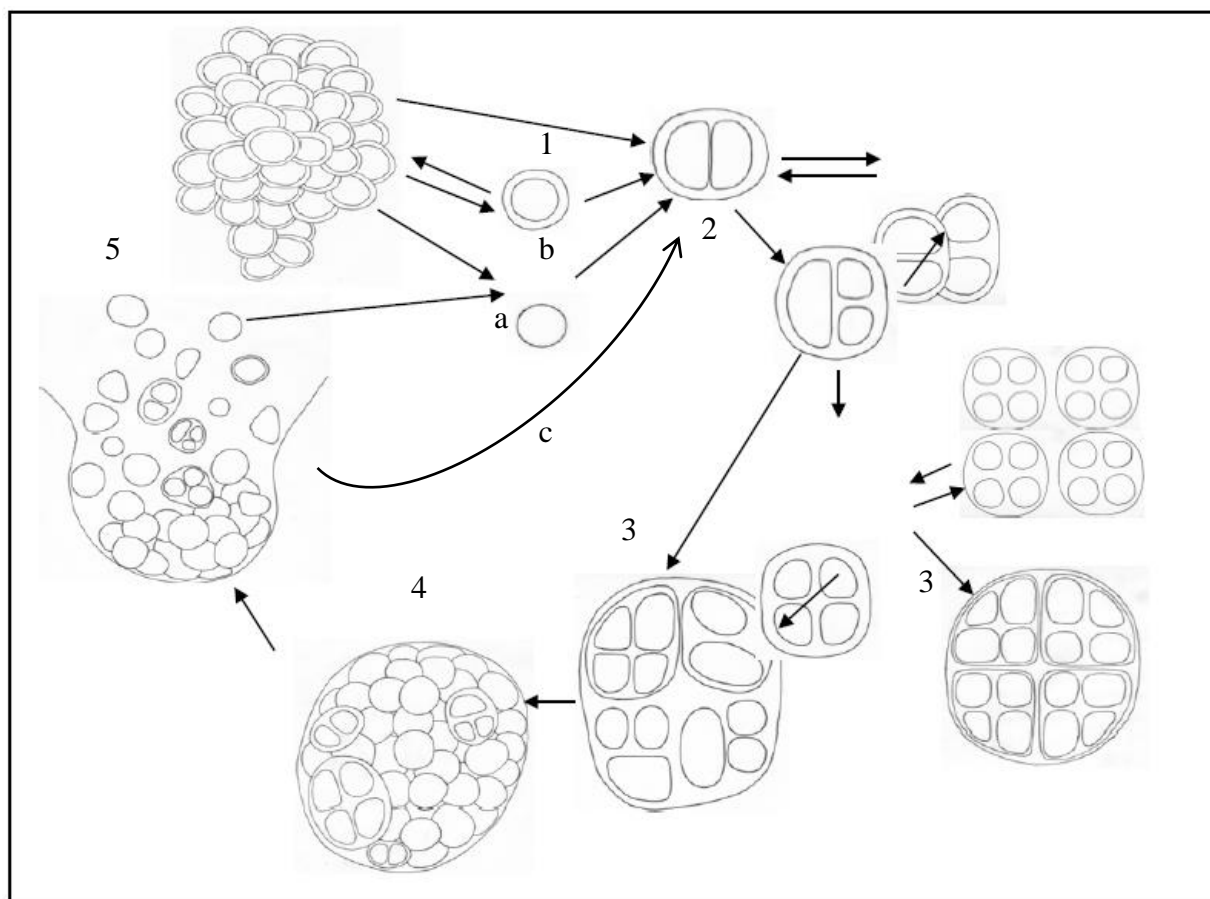


Figura 44: Modificación del esquema utilizado con permiso del Dr. Jan Kantosky que muestra los posibles diferentes estadios vitales de la cianobacteria presente en el interior de los nódulos de sal del desierto de Atacama. Partiendo de 1. las células se dividen por fisión binaria dentro de la cubierta externa que individualiza el agregado. 2. y 3. Sucesivas divisiones en tres planos (fisión múltiple) van generando agregados esféricos más o menos regulares de mayor tamaño, que se corresponden con la variedad de formas observadas mediante microscopía de campo claro y contraste de interferencia diferencial (Fig. 43). En algunos casos las células del agregado producen su propia cubierta externa manteniéndose en el interior de la cubierta original. 4. Formación de colonias con número variable de células. 5. Liberación de las células contenidas en la cubierta original y liberación de baecios no móviles que mantienen un tamaño similar a la de las células parenterales (diámetro en torno a los 3 μm) (a), células individuales con su cubierta (b), o cuyo proceso de fisión comenzó en el agregado colonial (c). En ocasiones, las células que conformaban la colonia permanecen unidas tras la ruptura de la cubierta inicial.

Estudio de la colonización y del microhábitat por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas.

La microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LT-SEM) permitió el análisis de los microhábitats donde se sitúan los agregados celulares y las interacciones que mantienen con el sustrato. En el caso de los nódulos de halita ha sido especialmente relevante el uso de esta técnica

puesto que ha permitido observar el agua (salmuera) dentro de la estructura porosa de los nódulos y ver como se posicionan los organismos en relación a su presencia.

Las muestras crio-fijadas y crio-fracturadas mostraron que en el interior de los nódulos se presentaban numerosos espacios entre los cristales de halita. Estos cristales (H en Fig. 45) mostraron signos de disoluciones parciales secundarias. En los espacios entre cristales se distinguió una estructura que presentaba una morfología a modo de red (S en Fig. 45) y microporos de diferente diámetro. Esta morfología está constituida por los restos de la salmuera (detalle en Fig. 45c y 45d), que se genera por disolución de los cristales de halita tras la captación de humedad del aire (Desbois, 2008; Wierzechos *et al.*, 2012b), tras la exposición a las bajas temperaturas utilizadas en esta técnica, por las cuales la salmuera pasa a un estado de equilibrio termodinámico conocido como hidrohalita ($\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), y la posterior pérdida de agua por sublimación a vacío que se lleva a cabo al introducir la muestra en la cámara crioscópica del microscopio electrónico de barrido. Los datos semicuantitativos obtenidos mediante microanálisis por EDS confirmaron que los elementos que componían estas redes eran Na, Cl y O, este último elemento procedente de partículas de agua cristalina. A su vez se observaron otros espacios libres de esta red (poros), algunos de ellos con aspecto de burbuja, que podrían haber estado ocupados por aire ya que no se observan restos de solutos (A en Fig. 45)

Los agregados de microorganismos se posicionan dentro de los nódulos ocupando estos espacios entre los cristales halita dentro de esta salmuera (o embebidos en ella) (flechas blancas en Fig. 45 y 46a) o adheridos a las paredes de los cristales de halita cercanos ajustando su forma al espacio entre cristales (flechas blancas en Fig. 46b, 46c y 46d). En ambos casos con mucha frecuencia se encuentran conectados a los poros, lo que podría facilitar el intercambio gaseoso (Fig. 45c, 45d y 46b) y próximos a posibles minerales de naturaleza distinta de la halita (Fig. 46c; 46d). La observación a mayores aumentos de los agregados celulares mostró a su vez el gran grosor de las cubiertas celulares de las cianobacterias (Fig. 47a y 47b) y en algunas ocasiones pudieron observarse células de menor tamaño adosadas a las cianobacterias (flechas negras en Fig. 46c, 46d y 47b).

Diferentes experimentos de deshidratación de la roca mostraron que la salmuera intersticial (en Fig 47c se muestra el estado hidratado 24h con $\text{HR} = 75\%$) tiene un carácter persistente apareciendo en muestras mantenidas a una humedad relativa externa controlada del 20% durante una semana (Fig. 47d). La deshidratación completa solo tuvo lugar cuando las muestras fueron introducidas en sílica gel y en estufa a 60°C durante 3 días (Fig. 47e).

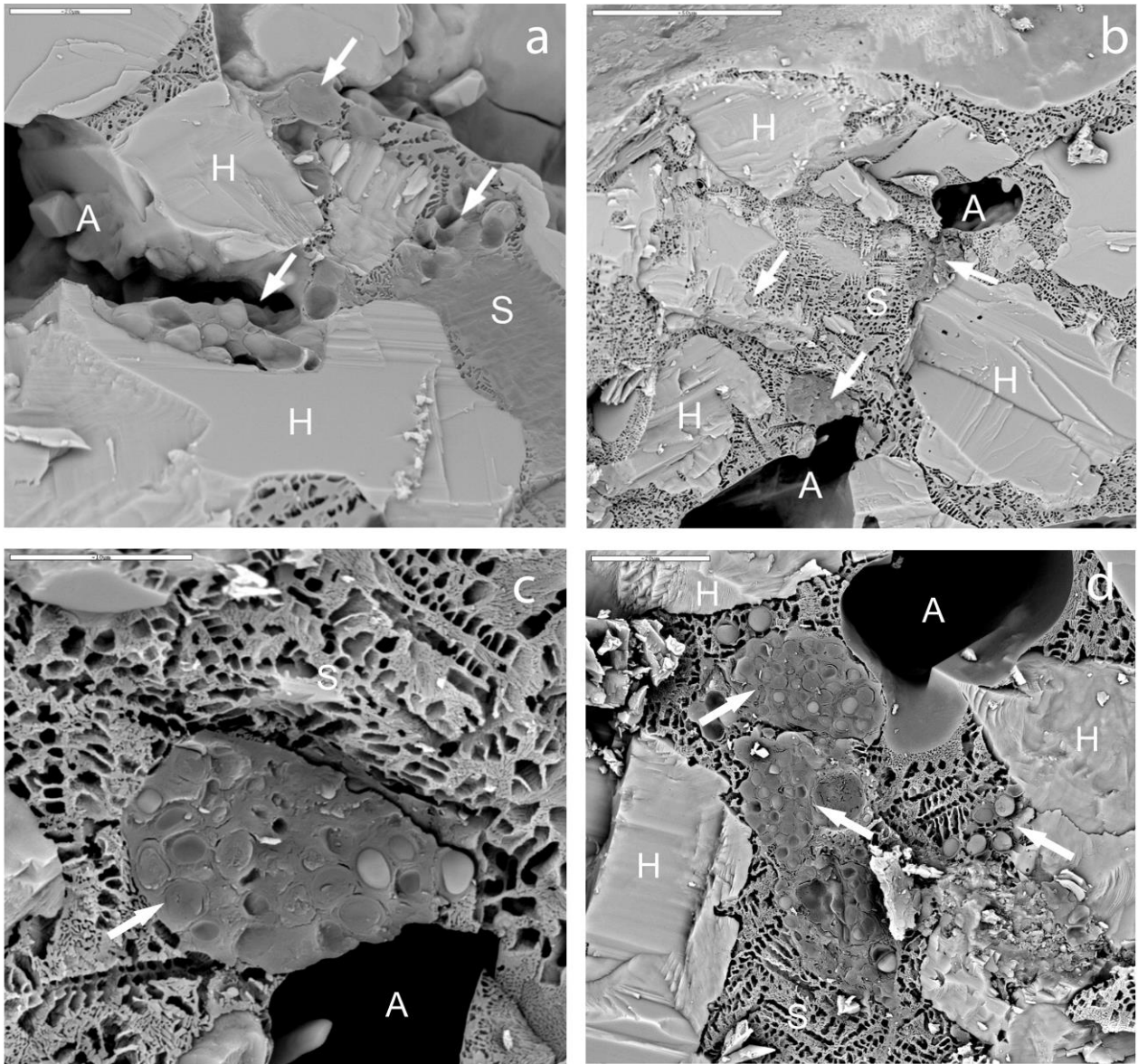


Figura 45: Micrografías obtenidas por LT-SEM de halitas colonizadas (I). a) y b) Imágenes contextuales del microhábitat y la colonización en el interior de los nódulos. H: cristales de NaCl; A: espacio vacío; S: restos de salmuera; la flechas blancas indican el posicionamiento de la colonización microbiana. Barra = 20µm y 50µm respectivamente c) Detalle de Fig. 45b Agregado de cianobacterias embebido en la salmuera (S) junto a un poro (A) véase detalle de las redes. Barra = 10µm d) Agregados embebidos en la salmuera (S) y posicionados junto a un poro (A) en Salar Grande. Barra = 20µm.

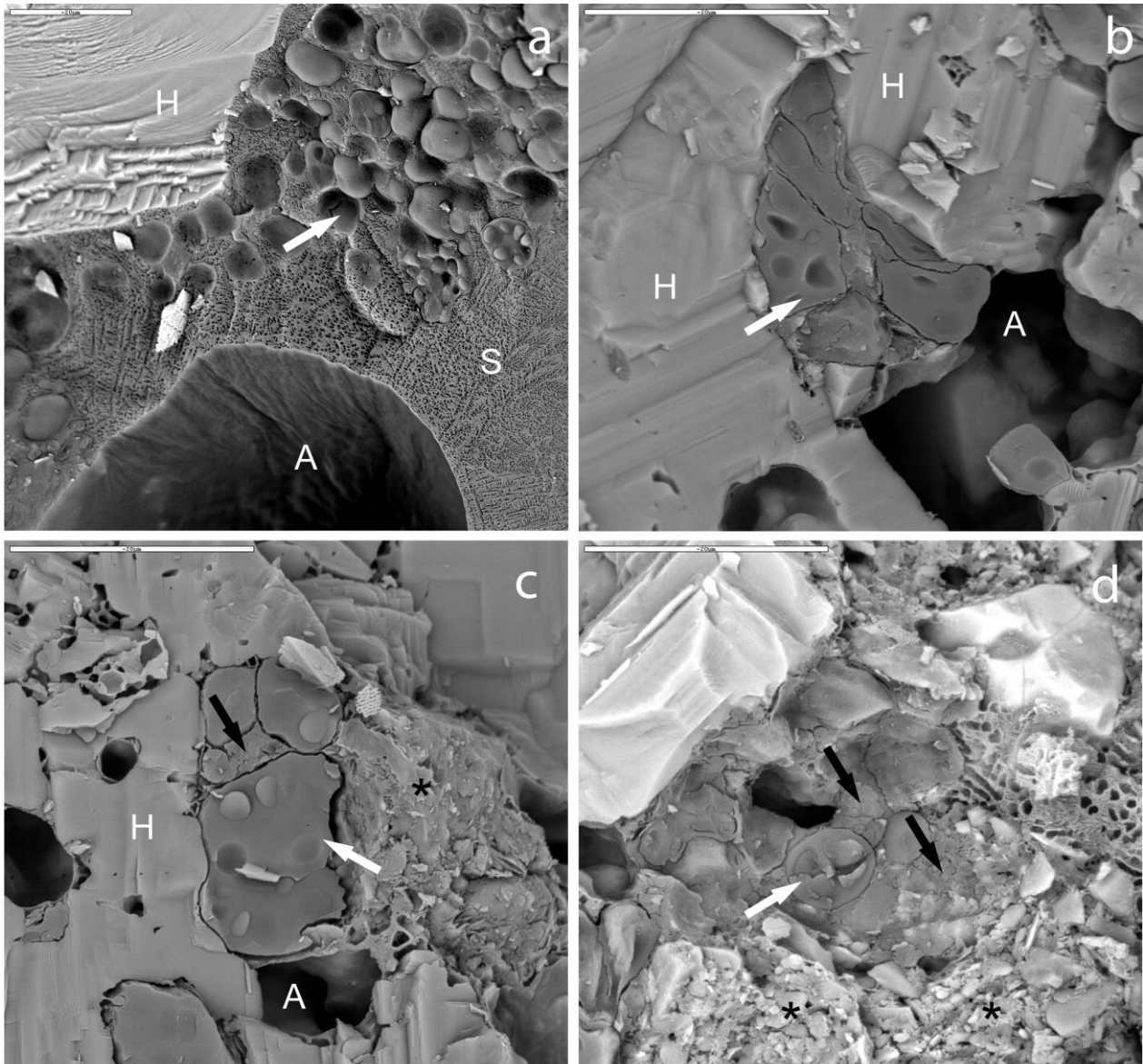


Figura 46: Micrografías obtenidas por LT-SEM de halitas colonizadas (II). a) Aglomeración de cianobacterianas (flecha blanca) embebidas en la salmuera y próximas a las paredes de un cristal de halita. Barra = 20µm. b) micrografía de un agregado de cianobacterias (flecha blanca) adherido y ocupando todo el espacio entre los cristales de sal (H) junto a un poro (A). Barra = 20µm c) y d) Agregados adosados a cristales de halita (H) y próximos a minerales de arcilla (asterisco negro *). Las flechas negras indican microorganismos asociados a la cianobacteria. Barra = 20µm.

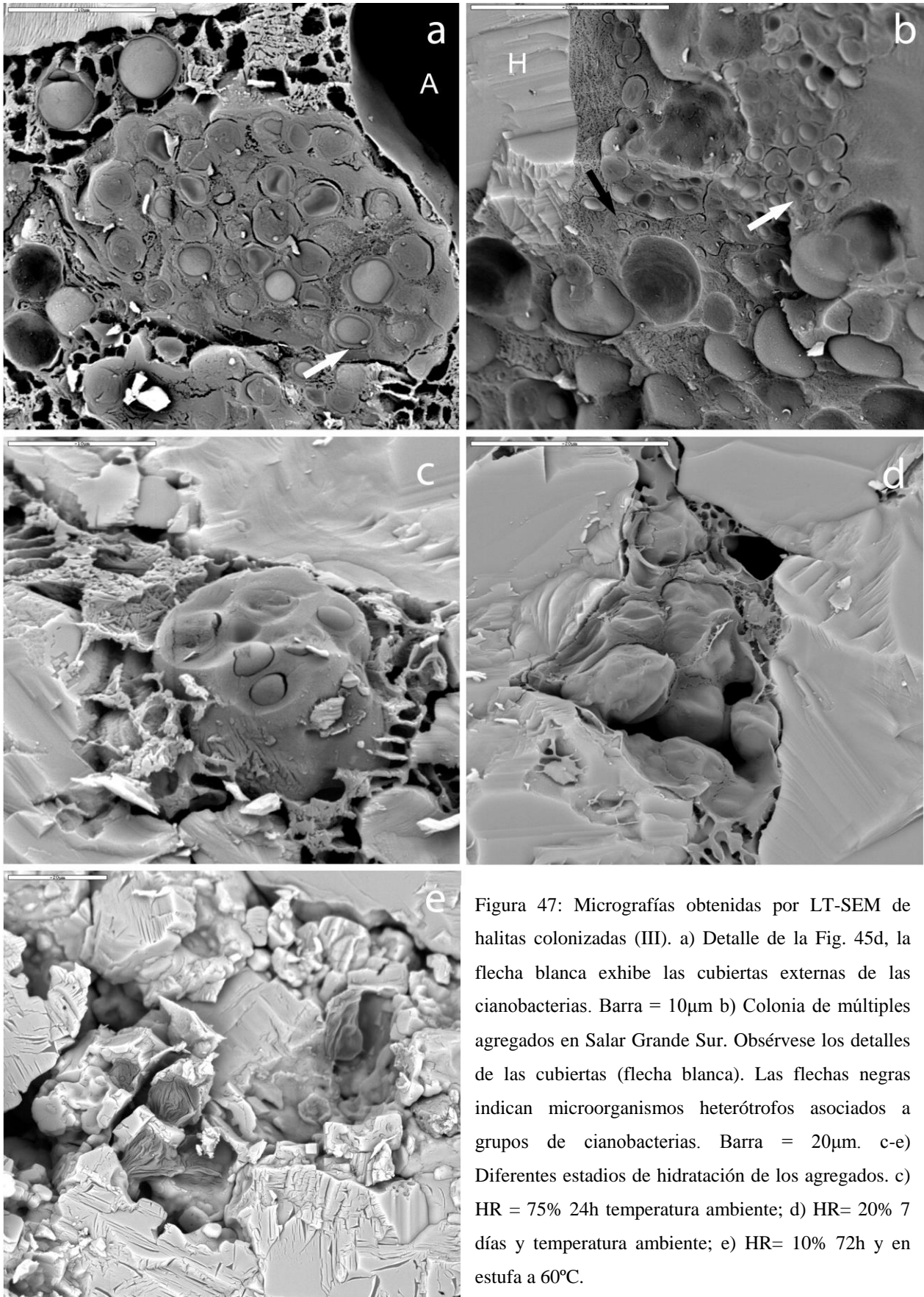


Figura 47: Micrografías obtenidas por LT-SEM de halitas colonizadas (III). a) Detalle de la Fig. 45d, la flecha blanca exhibe las cubiertas externas de las cianobacterias. Barra = 10 μ m b) Colonia de múltiples agregados en Salar Grande Sur. Obsérvese los detalles de las cubiertas (flecha blanca). Las flechas negras indican microorganismos heterótrofos asociados a grupos de cianobacterias. Barra = 20 μ m. c-e) Diferentes estadios de hidratación de los agregados. c) HR = 75% 24h temperatura ambiente; d) HR= 20% 7 días y temperatura ambiente; e) HR= 10% 72h y en estufa a 60°C.

Microscopía de Barrido Láser Confocal (CSLM) y de Fluorescencia (MF).

La observación por microscopia de fluorescencia de los agregados teñidos con diferentes fluorocromos (SYBR Green I, yoduro de propidio y DAPI) permitió una mejor visualización de la organización de los agregados de cianobacterias y los microorganismos heterótrofos asociados, las relaciones espaciales que mantienen entre sí, el estado de vitalidad de las células, así como detalles sus características morfológicas.

En las Fig. 48a y 48b a través de micrografías compuestas obtenidas mediante microscopía de barrido láser confocal y el uso de diferentes filtros se muestra la organización espacial de agregados celulares aislados procedentes de nódulos de halita de Yungay y Salar Grande Norte (respectivamente). Los análisis con esta técnica mostraron, como norma general, que los agregados de cianobacterias (identificadas por su intensa señal de autofluorescencia, visualizada en rojo y atribuida a la emisión de clorofilas y ficobiliproteínas) se encuentran rodeadas de grupos de microorganismos no autofluorescentes así como posibles sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (visualizados ambos en color verde por la tinción con SYBR Green I). La reconstrucción tridimensional de uno de los agregados observados en Salar Grande Norte (Fig. 48c) permite apreciar como estos grupos de microorganismos y los EPS se asocian estrechamente a las células de las cianobacterias, en ocasiones envolviendo completamente a estos agregados. Con estas observaciones, se confirman además los resultados obtenidos mediante microscopía de campo claro y contraste de interferencia diferencial en los que los aglomerados de células de menor tamaño y compuestos por un menor número de células en fase de división son más frecuentes en Yungay frente a los grandes conglomerados celulares con muchas células en fase de división observadas en Salar Grande Norte.

La tinción simultánea con yoduro de propidio y SYBR Green I (Fig. 48d) puso de manifiesto que en la mayor parte de las muestras se produce la coexistencia de microorganismos vivos (verdes) con aquellos que presentaban daños en su membrana celular (rojas). En comparación, fueron las muestras de Yungay las que mostraron una mayor proporción de células no vitales respecto al resto de localizaciones.

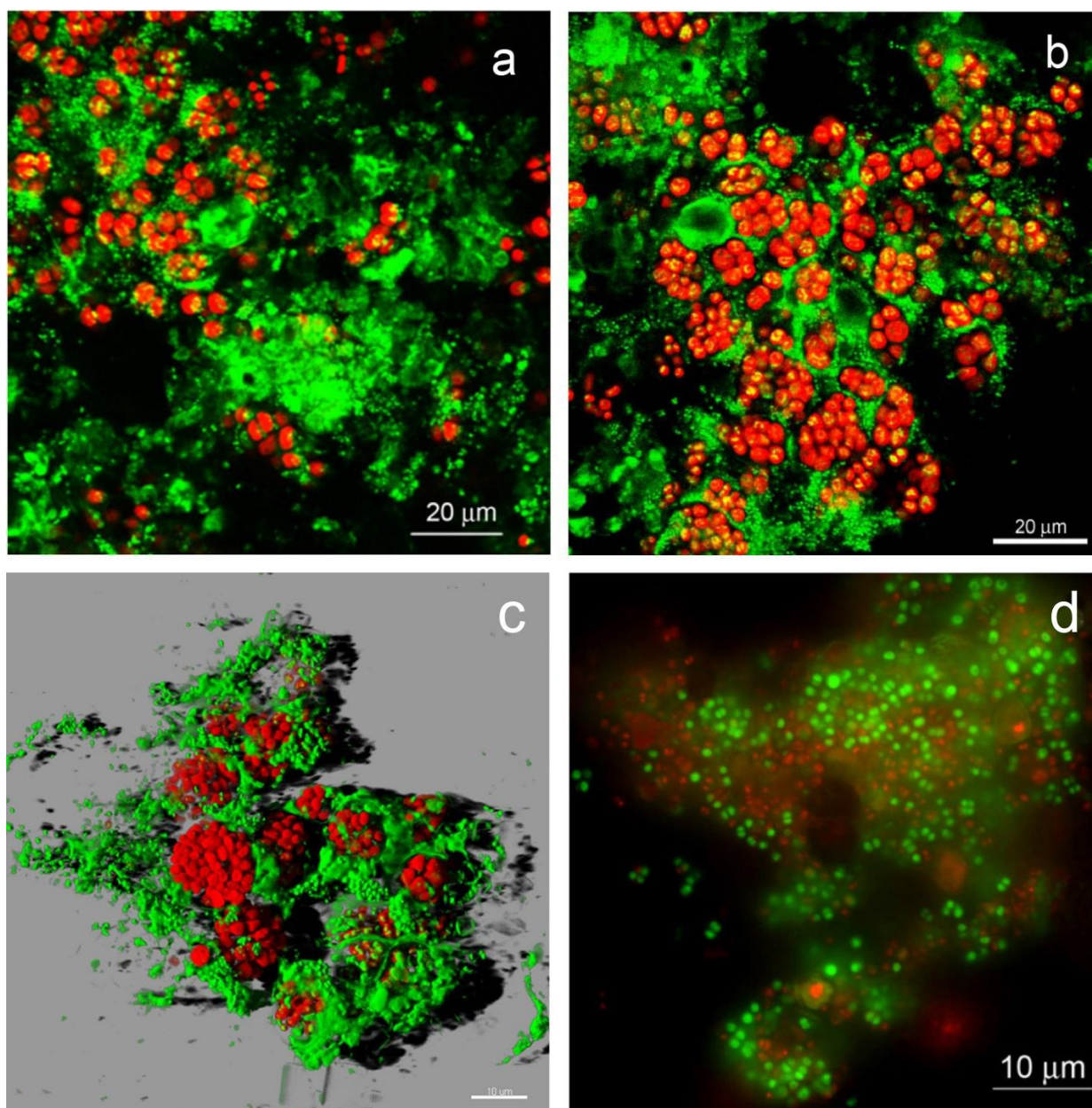


Figura 48: Micrografías obtenidas por CSLM de agregados de cianobacterias (autofluorescencia roja) asociadas con microorganismos heterotróficos y EPS (señal en verde) en Yungay a) y Salar Grande Norte b). c) Reconstrucción 3D de uno de los agregados microbianos hallados en Salar Grande que muestra la organización espacial de los distintos microorganismos que los componen. d) Test de viabilidad, en verde microorganismos con membranas intactas (SYBR Green I) y en rojo aquellos que presentan daño en la membrana celular (marcados con yoduro de propidio).

La observación de las muestras fijadas con formaldehído y teñidas con DAPI permitió una caracterización morfológica más precisa de los microorganismos en los nódulos y una visualización más clara de la organización de los agregados así como de los microorganismos que se asocian a las cianobacterias. Estas preparaciones, realizadas en filtro e iluminadas con luz UV (Fig. 49) mostraron, en todas las áreas de muestreo, que la mayoría de las células microbianas de

organismos no fotosintéticos (señal en azul intensa) se concentran en torno a las cianobacterias (cuya autofluorescencia se visualiza en rojo. Flechas blancas en Fig. 49) formando parte del agregado. Con esta combinación de luz incidente (UV) y el filtro específico para DAPI se pueden observar células de cianobacterias que no emiten autofluorescencia, y que se revelan en color azul-verdoso, que pueden ser reconocidas en función de su micromorfología característica y tamaño. A su vez, en las muestras de Salar Grande tanto en el Norte como en el Sur, se observaron también células algales, cuyos cloroplastos también presentan autofluorescencia (señal en rojo, * en Fig 49a), que pueden presentarse aisladas, asociadas a distintos microorganismos no fotosintéticos, o formando parte de agregados que también contenían cianobacterias. Estas células algales tienen forma esférica y entre 3-8 μm de diámetro y contienen un cloroplasto en forma de copa que se sitúa en posición parietal.

En las muestras analizadas, las cianobacterias parecían exhibir los tres tipos de estado definidos en el trabajo de Roldán y colaboradores (2014). Por un lado aquellas que emitían una intensa señal roja que podrían indicar un alto grado de viabilidad (flechas blancas en Fig. 49). Por otro, cianobacterias cuya señal de autofluorescencia era débil o poco apreciable pero en la que los nucleoides aparecen marcados con DAPI, lo que pudiera ser indicativo de células con bajo grado de viabilidad o en proceso de senescencia celular (flechas abiertas en Fig. 49). Y por último aquellas cianobacterias en las que sólo se reconoce su morfología externa y que no manifiestan autofluorescencia del aparato fotosintético ni los nucleoides marcados (en color azul-verdoso, punta de flecha > en Fig 49), que podrían ser interpretadas como células no viables o restos de cianobacterias muertas.

Atendiendo a la morfología y la forma de organización de los microorganismos no fotosintéticos asociados a las cianobacterias, y tomando en conjunto todas las áreas de muestreo, se reconocieron al menos 20 tipologías diferentes (numeradas en Fig 43 y Fig 49) que incluyen cocos y cocobacilos de diferente tamaño, los más abundantes y frecuentemente, organizados en parejas, tétradas o sarcinas (nº 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13; 14, 15, 16), bacilos (12, 17 y 18), vibrios (nº 20) y espirilos (nº 19) que presumiblemente pueden corresponderse con distintas bacterias heterótrofas y arqueas. Al comparar muestras de distintas localizaciones se observaron diferencias en relación a las agrupaciones con organismos no fotosintéticos. En Yungay se dio el número de tipos y las menores abundancias relativas, mientras que la mayor diversidad de formas, así como la abundancia de estas, se encontró en Salar Grande Sur. Llamará y Salar

Grande Norte presentaron un nivel intermedio y mayores similitudes entre sí en la composición de tipos que conforman sus agregados.

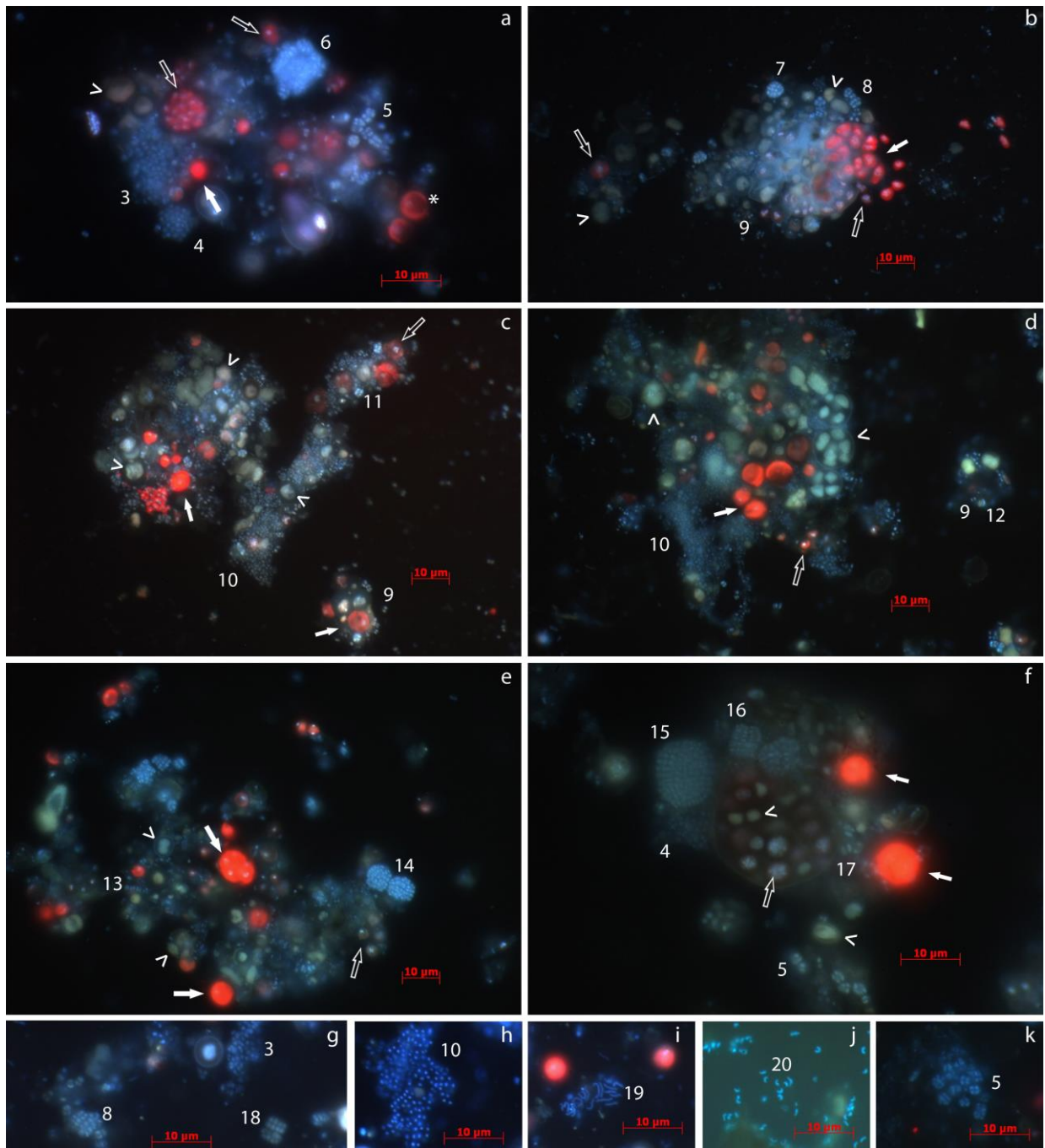


Figura 49: Microscopia de fluorescencia organismos autofluorescentes y marcados con DAPI. a) b) c) d) e) f) Muestran distintas agrupaciones de cianobacterias (señal en rojo y azul verdoso) y microorganismos no fotosintéticos (señal en azul), que aparecen numerados en las distintas imágenes, formando los agregados. Flechas blancas = cianobacterias con alto grado de viabilidad; Flechas abiertas = Cianobacterias inactivas o senescentes; Signo > = Cianobacterias no viables o muertas. * = célula de alga. g), dos tipos de sarcinas regulares (8 y 18) y agrupación de diplococos (3). h) Sarcina irregular de cocos (10). i) Bacilos de gran tamaño posiblemente espirilos (19). j) Bacilos curvados posiblemente vibrios (20) k) Agrupación de cocos en tétradas regulares (10). Nota: las imágenes tienen resolución suficiente para su ampliación en la copia digital.

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

El estudio de las secciones ultrafinas por TEM permitió caracterizar la ultraestructura de las células de cianobacterias presentes en los nódulos de halita y de algunos microorganismos no fotosintéticos asociados, así como la forma en la que se asocian entre ellos.

La visualización por TEM mostró que las cianobacterias viables presentan los tilacoides organizados paralelamente a la membrana celular (Fig. 50). En el citoplasma de estas células se observaron distintas inclusiones, como gránulos electróndensos, que podrían corresponderse en su mayoría con gránulos de almacenamiento (e.g. gránulos de polifosfato) (Fig. 50A y 50B). Como elemento característico de esta cianobacteria se observó una gran cubierta externa, que contiene una capa externa electróndensa ancha (flecha negra en Fig. 50A y 50B), seguida hacia el interior celular de un espacio de carácter electropositivo muy ancho y de aspecto fibroso (barra en Fig. 50A). El grosor de esta cubierta se mostró mayor en las muestras de Yungay (Fig. 50C) respecto a las preparaciones de Salar Grande (Fig. 50D).

Por otro lado, se pudo confirmar la coexistencia de células cianobacterianas en distinta fase de su ciclo de vida, como células individuales (Fig. 50A), en fase de división binaria (Fig. 50B y 50C) y células individualizadas formando el agregado y que parecían estrechamente adosadas entre sí (Fig. 50 D), posiblemente a través de polisacáridos extracelulares (flecha blanca en Fig. 50C). En este sentido se observó a su vez como los microorganismos heterótrofos (flechas negras en Fig. 50D, 51A, 51B y 51C) se asocian estrechamente a la membrana externa de las cubiertas de la cianobacterias tanto de células viables (Fig. 50D, 51C y 51D) como de células muertas o dañadas (Fig. 51A y 51B) en las que en ocasiones penetran en el interior de celular (Fig. 51B). Como en el caso de la figura 51A (flecha blanca) se observaron además asociaciones entre microorganismos no vinculados a las cianobacterias.

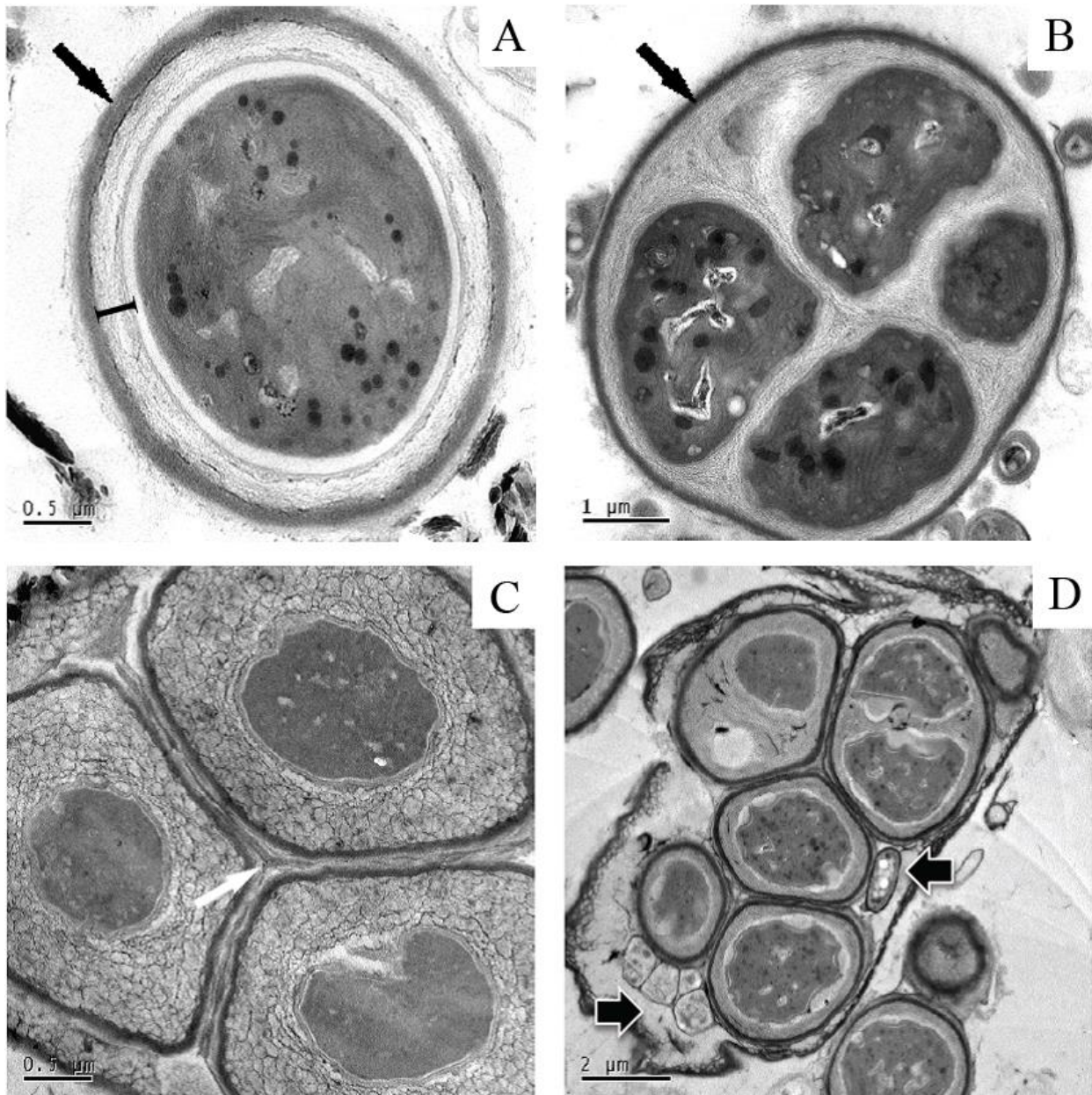


Figura 50: Microscopía electrónica de transmisión (I). A) Célula de cianobacteria que muestra los principales elementos ultraestructurales: tilacoides organizados paralelamente a la membrana y posibles gránulos de almacenamiento electróndensos, cubierta externa (barra), parte externa gruesa y electróndensa de la cubierta (flecha negra). B) Cianobacteria en fase de división Flecha negra indica membrana externa. C) Células de cianobacterias en Yungay completamente divididas y separadas por sus membranas externas. La flecha en blanco indica posibles EPS secretados por las cianobacterias que mantienen cohesionado los agregados. F) Agregado de cianobacterias en Salar Grande estrechamente unido con microorganismos heterótrofos íntimamente asociados (flechas negras).

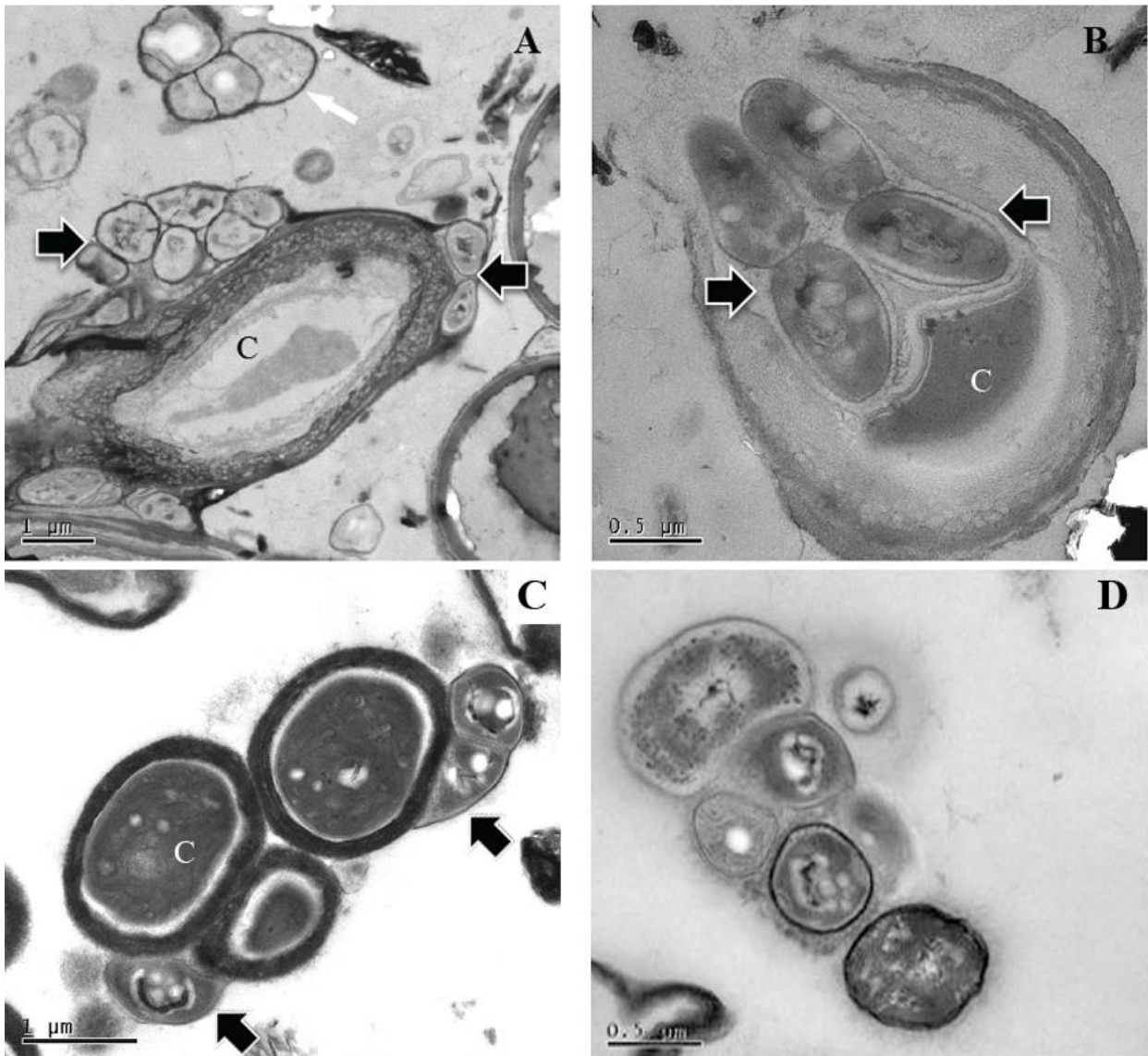


Figura 51: Microscopía electrónica de transmisión mostrando la asociación íntima de microorganismos heterótrofos con células de cianobacterias. A) y B) asociación de microorganismos heterótrofos (flechas negras) a células de cianobacteria (c) dañadas e incluso penetrando en su interior (B). C) y D) asociación de microorganismos heterótrofos (flechas negras) a células de cianobacteria (c) con características ultraestructurales correspondientes a células vivas.

Caracterización de la diversidad microbiana por técnicas de biología molecular.

Perfiles de DGGE

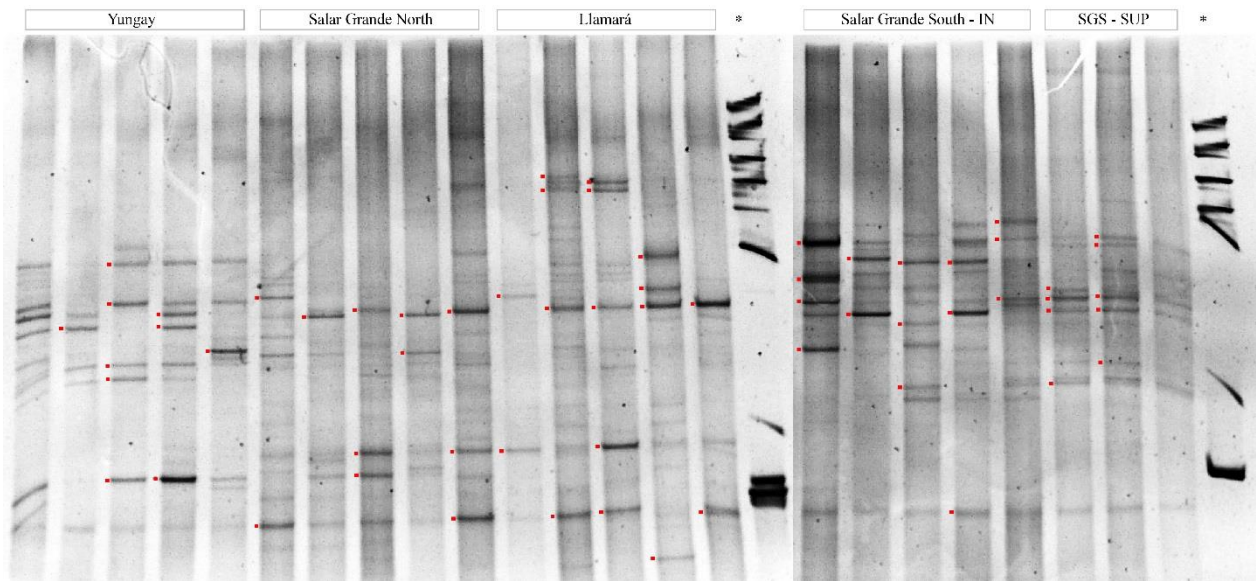
Los perfiles obtenidos en los geles de DGGE mostraron, de forma general, un reducido número de bandas de intensidad variable en cada muestra y diferencias tanto entre muestras procedentes de una misma localidad como entre las distintas áreas de muestreo (Fig. 52).

El análisis diferenciado por dominio de los perfiles de DGGE mostró, por un lado, que las comunidades de arqueas (Fig. 52a) presentaban mayor riqueza de bandas con una media de unas 10 bandas por muestra, salvo en el caso de Yungay cuya media se situó en torno a 6, siendo 21 el número máximo de bandas detectadas en una de las muestras de Lllamará. A su vez, se observó una elevada heterogeneidad de los perfiles entre muestras dentro de una misma localidad así como entre las diferentes áreas de muestreo, no habiéndose detectado para este caso dos perfiles iguales. Sin embargo, se observó que las bandas de mayor intensidad mostraban un patrón más similar entre muestras que pertenecían a una misma localización que aquellas bandas que aparecían en el gel de una forma más tenue.

Por otro lado, los perfiles correspondientes al dominio Bacteria (Fig. 52b) presentaron un menor número de bandas, unas 4 bandas de media por muestra en las localizaciones de Yungay, Salar Grande Norte (SGN) y Lllamará y unas 7 en Salar Grande Sur tanto en la colonización interior (SGS-IN) como la superficial (SGS-SUP). A diferencia de lo que ocurría en el caso de las arqueas, los perfiles de bacterias fueron más consistentes tanto dentro de cada localización como entre ellas, siendo los ejemplos más claros los patrones de Salar Grande Norte y Lllamará que fueron muy similares.

Analizados los perfiles, se cortaron las bandas de mayor intensidad (marcadas en rojo en Fig 52) y fueron procesadas para su posterior secuenciación. En la figura 53A se muestra un esquema que representa la presencia y ausencia de los distintos OTUs (97% similitud) obtenidos, en las distintas localizaciones, tanto para arqueas (parte superior) como para bacterias (parte inferior). A su derecha se ha situado un diagrama de Venn que muestra los OTUs totales (arqueas y bacterias) compartidos entre las distintas áreas de muestreo (Fig. 53B). En la parte inferior de se muestra un dendrograma con los resultados de un análisis de similitud entre localizaciones basado en el índice de Sorensen en base a la presencia y ausencia de OTUs en cada área de muestreo (Fig. 53C).

a



b

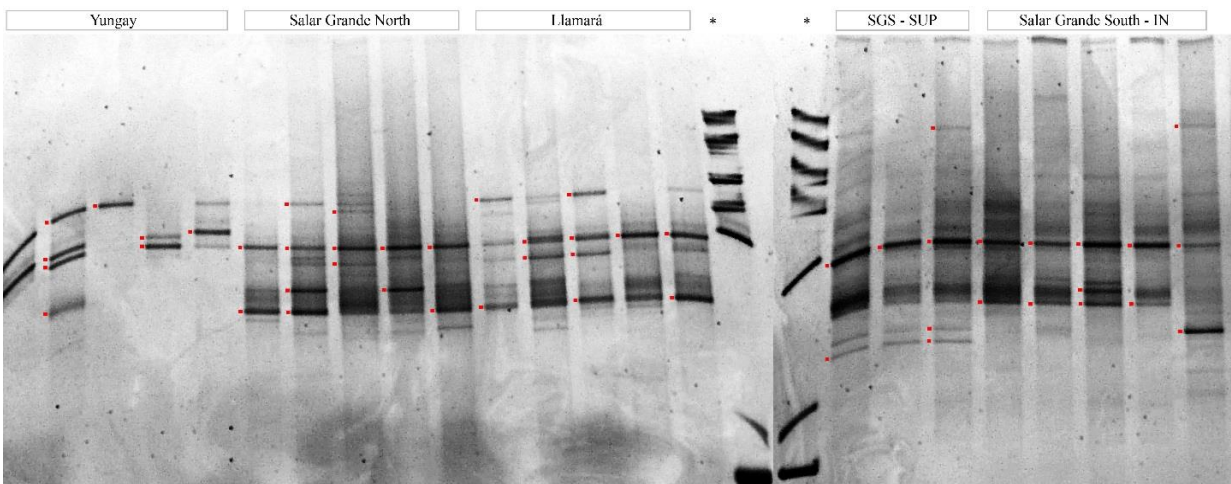


Figura 52: Perfiles obtenidos por PCR-DGGE de fragmentos de la región del gen que codifica para el ARNr 16S. a) Perfil correspondiente al dominio Arquea. Cebadores a109f y 515r g+c (358-398pb) b) Perfil correspondiente al dominio Bacteria. Cebadores 341f g+c y 907r (532-556pb). Señaladas con un cuadrado rojo a la izquierda las bandas que fueron cortadas. * Marcador electroforético. Nota: La colonización superficial de Salar Grande Sur (SGS-SUP) sólo presenta 3 carriles porque de los 5 nódulos utilizados en el análisis solo 3 presentaban este tipo de colonización.

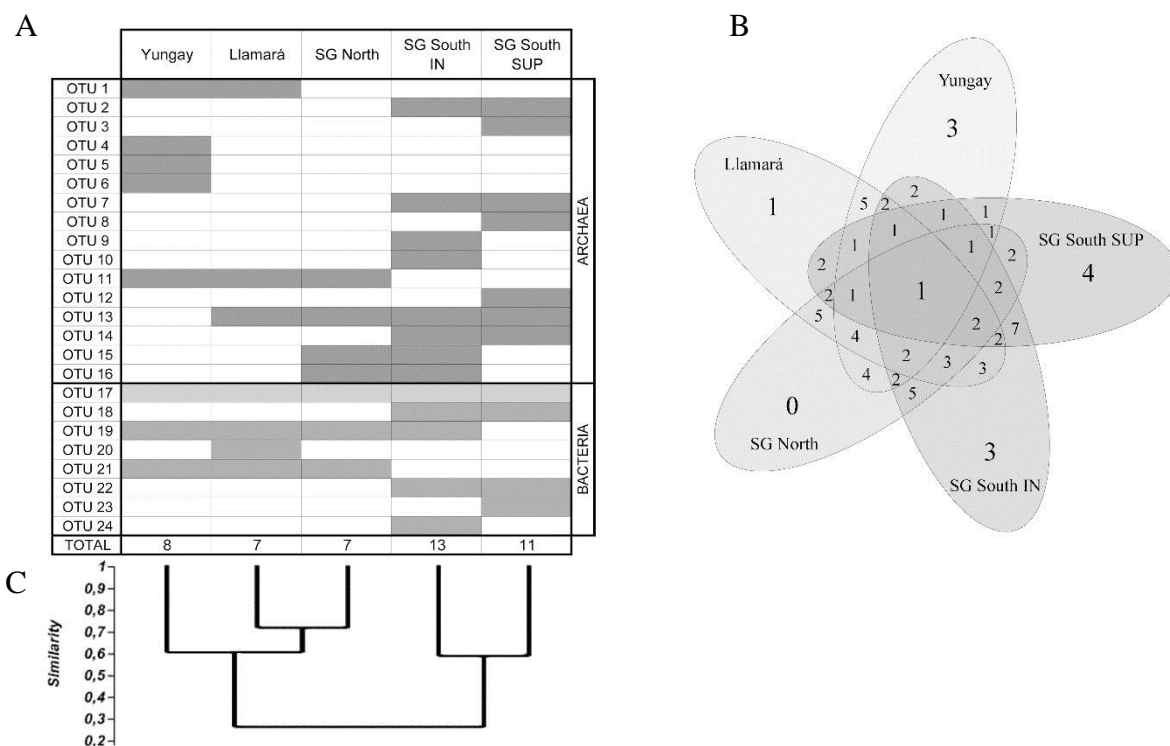


Figura 53: A) Esquema de presencia-ausencia de los distintos OTUs obtenidos por secuenciación de las principales bandas escindidas de DGGE. B) Diagrama de Venn que muestra el número de OTUs compartidos. C) Dendrograma con los resultados del análisis de similitud entre localizaciones basado en el índice de Sorensen (presencia/ausencia de OTUs).

Del mismo modo que ocurría al analizar los perfiles de DGGE, las mayores diferencias en OTUs entre las comunidades de las distintas áreas de muestreo fueron detectadas en el dominio *Arquea*. Entre los OTUs de este dominio se observó gran variación entre las localizaciones, siendo destacable que las localidades de Yungay y Salar Grande Sur no presentaban ningún OTU en común (Fig. 53A). El número total de OTUs diferentes de arqueas detectado fue 16.

En el caso del dominio *Bacteria*, se encontraron en conjunto 8 OTUs diferentes (Fig. 53A). En este caso las similitudes entre las diferentes áreas de muestreo fueron mayores, pudiendo establecerse dos grandes grupos, uno que englobaría a Yungay, Llamará y Salar Grande Norte, que se caracteriza por la presencia constante de los OTUs 19 y 21, y otro conformado por las dos colonizaciones de Salar Grande Sur que presentan de forma común los OTUs 18 y 22, no presentes en el resto de localizaciones.

La localidad donde se detectó un mayor número de OTUs dominantes, tanto de arqueas como de bacterias, fue Salar Grande Sur tanto en SGS-IN como en SGS-SUP, mientras que las poblaciones que presentaron menor número de OTUs fueron Llamará y Salar Grande Norte.

En base a los OTUs compartidos entre las diferentes áreas de muestreo (Fig. 53B), sólo el OTU 17 (correspondiente con una secuencia de cianobacteria, ver a continuación) exhibió presencia constante en todas las muestras analizadas. Sin embargo teniendo en cuenta las localidades y no desglosando los resultados de Salar Grande Sur en dos zonas de colonización diferentes, el OTU 19 (próximo a *Salinibacter*) se detecta como otro elemento común a todas ellas. Los dos grupos de muestras que más elementos presentaron en común fueron las que provenían de SGS-IN y SGS-SUP que comparten 7 OTUs, mientras que las localidades más parecidas en función del índice de Sorensen fueron Llamará y Salar Grande Norte (Fig. 53C). Las localizaciones más diferentes entre sí fueron Yungay y Salar Grande Sur, tanto la colonización interna como la bandeada superficial (Fig. 35c), que sólo comparten el OTU 17 y el OTU 19. Cabe destacar que las localidades de Yungay y SGS fueron las que presentaron a su vez un mayor número de OTUs no compartidos con el resto de localizaciones.

Afiliaciones taxonómicas

En la tabla 4 se recoge la información de las secuencias del Genbank que presentaron mayor porcentaje de similitud con las secuencias de los OTUs obtenidos a partir de las bandas de DGGE incluida la descripción del ambiente del que fueron tomadas. Como se puede observar muchas de ellas se corresponden con organismos no cultivados por lo que se incluye además una columna con las secuencias y el grado de similitud correspondiente al organismo identificado más parecido.

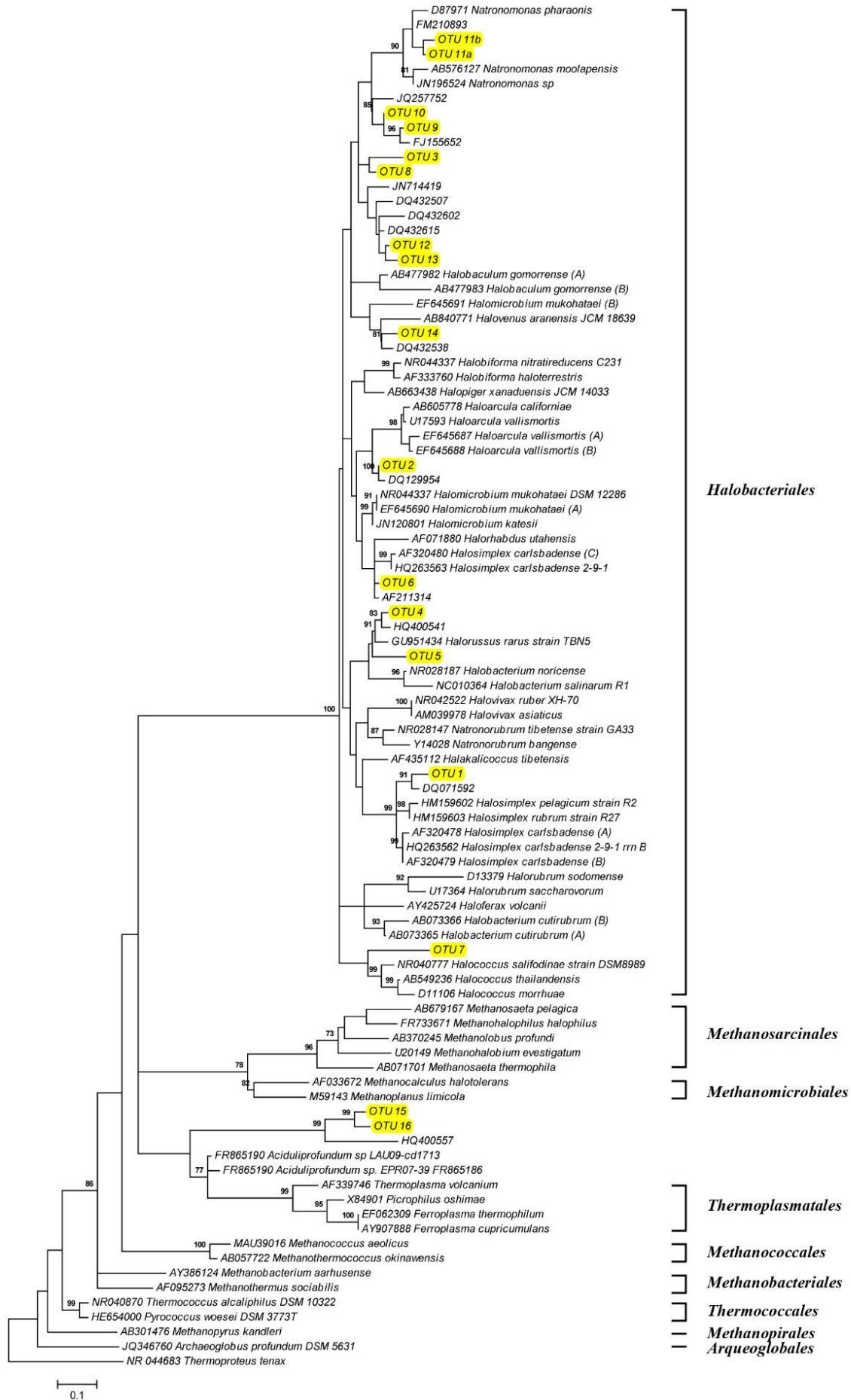
El análisis filogenético mediante el método de máxima verosimilitud de los OTUs de arqueas correspondientes a fragmentos del gen que codifica para el ARNr 16S (Fig. 54) situó todos los OTUs obtenidos dentro del phylum *Euryarchaeota*, casi todos dentro de la clase *Halobacteria*. El OTU 1 se situó dentro de un cluster soportado estadísticamente al 99% formado por secuencias pertenecientes a géneros de *Halosimplex* (aunque con solo una similitud del 93% con secuencias de este género del Genbank). El OTU 2, forma parte de un clado con secuencias del género *Haloarcula* y constituye un subgrupo soportado estadísticamente con una arquea no cultivada de un lago atalasosalino del noroeste de China. El OTU 6 se situó en un rama hermana junto con secuencias de los géneros *Halomicrobium*, *Halorhabdus* y el operon c de *Halosimplex carlsbadense*. Los OTUs 3, 8, 9, 10, 11a 11b, 12 y 13 se situaron en un mismo clado que presentaba bajos soportes de sus ramas, junto con secuencias de los géneros *Natronomonas*,

Halobaculum, *Halomicrobium* y *Halovenus*. Los OTUs 4 y 5 se situaron dentro de un clado que contenía una secuencia de *Halorussus rarus* y también secuencias del género *Halobacterium*. El OTU 7 se situó en la base de un cluster formado por diferentes secuencias del género *Halococcus* el cual estaba soportado al 99%. El OTU 14 quedó englobado dentro de un clado soportado estadísticamente con secuencias del operón b de *Halomicrobium mukohataei* y de *Halovenus aranensis*. Los OTUs 15 y 16, se situaron fuera de la Clase *Halobacteria* formando un subgrupo soportado estadísticamente junto con una secuencia obtenida de suelos salinos y alcalinos contaminados por hidrocarburos en China.

El estudio taxonómico de los OTUS pertenecientes al dominio *Bacteria* presentes en los nódulos de halita mediante el método de máxima verosimilitud permitió encuadrar a estos dentro de distintos *phyla* (Fig. 55). El OTU 17 se situó dentro del *phylum Cyanobacteria*, dentro de un clado soportado estadísticamente con secuencias del género *Halothece*. El resto de OTUs se agruparon con secuencias de los *Phyla Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. Los OTUs 19a, 19b, 20, 21, 22, y 23 forman un clado soportado estadísticamente con secuencias de la clase *Sphingobacteriales*. Los OTUs 19a y 19b, junto con dos secuencias obtenidas en trabajo previo sobre el mismo material (De los Rios *et al.*, 2010), forman un subgrupo soportado estadísticamente con una secuencia de *Salinibacter ruber*. Los OTUs 20 y 21, forman otro subgrupo soportado estadísticamente junto con otra secuencia proveniente de nódulos de halita (De los Rios *et al.*, 2010) junto con una secuencia descrita en suelos de la estación de Ecología de Desiertos de Fukang, provincia de XiJiang, China y otra en paredes de calcarenita en tumbas subterráneas de una necrópolis romana de Sevilla. El OTU 22 forma parte de un clado soportado estadísticamente junto a una secuencia del *phylum Bacteroidetes* descrita en una mina de sal y que incluye una secuencia del género *Balneola*. El OTU 23 está dentro de un clado soportado estadísticamente conformado por secuencias de *Sphingobacteriales* y *Flavobacteriales*. El OTU 24 forma parte de un subgrupo soportado estadísticamente (100%) junto con secuencias del género *Salinisphaera* dentro de un clado soportado al 99% con secuencias de *Pseudomonas* halófila, *Chromohalobacter marismortui* y *Halothiobacillus halophilus* que se encuentran incluidas dentro de la Clase *Gamma-Proteobacteria*. Los OTUs 18a y 18 b se sitúan en un clado no soportado junto con secuencias de *Desulfobacterales*, *Desulfomonadales* y *Desulfovibrionales* que pertenecen a la Clase *Delta-Proteobacteria*.

Tabla 4: Correlaciones obtenidas entre las secuencias parciales de arqueas (358-398bp) y bacterias (532-556bp) con las secuencias presentes en la base de datos del

Genbank OTU	Length (bp)	Closest relative	Similarity	Sample Type	Best Match Identified	Similarity
ARCHAEA						
OTU 1	360	Uncultured haloarchaeon clone Sect16SE2 16S ribosomal RNA gene [DO071592]	97%	Crystallizers of Adriatic Solar Saltern	Halosimplex carlsbadense 2-9-1 strain JCM 11222 clone mB 16S ribosomal RNA gene, complete sequence. [HQ263562]	93%
OTU 2	358	Uncultured archaeon clone LCKW-A2 16S ribosomal RNA gene [DO123954]	98%	Afrallassohaline lake in northwestern china	Halomicrobium katesii 16S ribosomal RNA (rm1) gene, partial sequence [JN120801]	94%
OTU 3	358	Uncultured archaeon clone WN-UWA-162 16S ribosomal RNA gene [DO432602]	91%	Hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt	Halovivax ruber XH-70 strain: XH-70 16S ribosomal RNA, complete sequence. [NR 042522]	89%
OTU 4	358	Uncultured archaeon clone CK519 16S ribosomal RNA gene [HQ400541]	97%	Hydrocarbon contaminated saline alkaline soils in China	Halorussus rarus strain TBN5 16S ribosomal RNA gene [GU951434]	96%
OTU 5	358	Halorussus rarus strain TBN5 16S ribosomal RNA gene [GU951434]	93%	Artificial marine solar saltern near Yellow Sea	Natrononrubrum tibetense strain GA33 16S ribosomal RNA, complete sequence. [NR 028147]	92%
OTU 6	358	Uncultured Halobacteriales MT17 16S ribosomal RNA gene [AF211314]	99%	Hypersaline black mud San Francisco Bay	Halosimplex carlsbadense 2-9-1 strain JCM 11222 clone mC 16S [HQ263563]	97%
OTU 7	358	Halococcus thailandensis gene for 16S ribosomal RNA [AB549236]	89%	Culture collection	Halococcus salifodinae strain DSM8989 16S ribosomal RNA, complete [NR 040777]	89%
OTU 8	358	Uncultured haloarchaeon clone XKL18 16S ribosomal RNA gene [JN714419]	94%	Salt lake in Xinjiang in China	Natronomonas moolepensis gene for 16S ribosomal RNA [AB576127]	92%
OTU 9	358	Uncultured archaeon clone CEHLW-A36 16S ribosomal RNA gene [FJ155652]	97%	Saline lakes on the Tibetan Plateau	Halobaculum gomorense gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 9908, m1A. [AB477982]	90%
OTU 10	358	Uncultured archaeon clone KJ-UA-159 16S ribosomal RNA gene [JQ257752]	94%	Tropical marine sediment from Arabian Sea coast Karwar India	Halomicrobium mukohataei DSM 12286 strain JCM9738 16S ribosomal RNA, complete sequence [NR 044337]	92%
OTU 11	358	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone XA40 [FM210893]	97%	Salt lake brine Inner Mongolia China	Natronomonas sp. GV-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [JN96524]	96%
OTU 12	358	Uncultured archaeon clone WN-HSA-28 16S ribosomal RNA gene [DO432615]	97%	Hypersaline Lake Hamra sediment, Wadi An Natrun Egypt	Halomicrobium mukohataei DSM 12286 strain JCM9738 16S ribosomal RNA, complete sequence [NR 044337]	94%
OTU 13	398	Uncultured archaeon clone WN-FWA-27 16S ribosomal RNA gene [DO432507]	89%	Hypersaline Lake Fazda sediment Wadi An Natrun Egypt	Halobiforma nitratireducens C231 16S ribosomal RNA, partial sequence. [NR_028153]	96%
OTU 14	358	Uncultured archaeon clone WN-FWA-190 16S ribosomal RNA gene [DO432538]	95%	Hypersaline Lake Fazda sediment Wadi An Natrun Egypt	Halobaculum californiae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 8912. [AB605778]	90%
OTU 15	356	Uncultured archaeon clone CK562 16S ribosomal RNA gene [HQ400557]	87%	Hydrocarbon contaminated saline alkaline soils in China	Aciduliprofundum sp. LAU09-cd1713 partial 16S rRNA gene, isolate LAU09-cd1713. [FR865190]	80%
OTU 16	356	Uncultured archaeon clone CK562 16S ribosomal RNA gene [HQ400557]	86%	Hydrocarbon contaminated saline alkaline soils in China	Aciduliprofundum sp. EPR07-39 partial 16S rRNA gene, isolate EPR07-39. [FR865186]	81%
OTU 17	532	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone CAR-BSB-F3 [FN298045]	95%	Calcarene walls Underground toms from Roman Necropolis of Carmona Seville	Halotheca sp. 16S rRNA gene, strain MPI 96P605. [AJ000724]	92%
OTU 18	556	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: 2B16SG02 [AB533880]	97%	Salt Pan Death Valley, California, USA	Desulfuromonadales bacterium Tc37 gene for 16S rRNA, partial sequence. [AB260047]	82%
OTU 19	547	Uncultured bacterium clone ARDBACSS3 16S ribosomal RNA gene, partial [EU869377]	98%	Soil, Sidi Ameur Salt Lake, Algerian Sahara	Salinibacter ruber strain POLA 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [AF323502]	96%
OTU 20	555	Uncultured bacterium clone 4-16 16S ribosomal RNA gene [JQ712885]	89%	Environmental sample: Xinjiang province China	Salinibacter ruber strain POLA 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [AF323502]	84%
OTU 21	555	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone CAR-U21b-A5 [FN298012]	90%	Calcarene walls Underground toms from Roman Necropolis of Carmona Seville	Salinibacter ruber strain POLA 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [AF323502]	86%
OTU 22	547	Bacteroidetes bacterium YIM D17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [HM153810]	95%	Salt mine	Balheola sp. YCSA29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [G1316277]	88%
OTU 23	547	Uncultured bacterium clone E6aC11 16S ribosomal RNA gene, [DO103647]	95%	Hypersaline endoevaporitic microbial mat	Chitinophagaceae bacterium NYFB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [JQ033715]	87%
OTU 24	556	Uncultured bacterium clone P13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [EU912006]	97%	Pink lake Western Australia	Salinisphaera shabanensis strain F75067 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [JF281734]	96%
BACTERIA						



◀Figura 54: Análisis filogenético de las secuencias parciales de arqueas presentes en los nódulos de sal. Topología del árbol inferida mediante máxima verosimilitud (ML) bajo un modelo de sustitución GTR + Γ + I. Los valores de bootstrap (1000 replicas) por encima del 70 % se encuentran recogidos en los nodos del árbol.

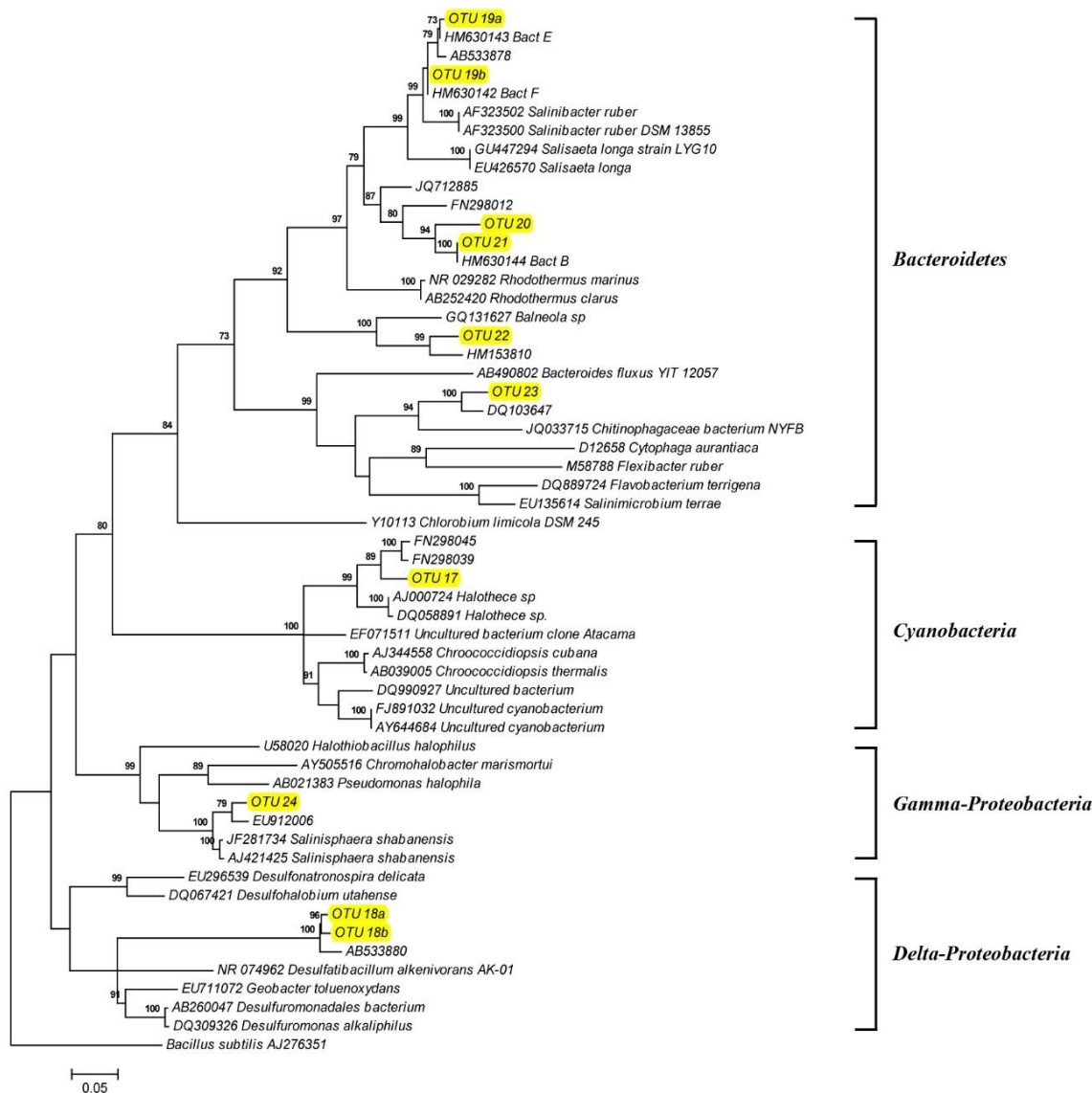


Figura 55: Análisis filogenético de las secuencias parciales de bacterias presentes en los nódulos de sal. Topología del árbol inferida mediante máxima verosimilitud (ML) bajo un modelo de sustitución GTR + Γ + I. Los valores de bootstrap (1000 replicas) por encima del 70 % se encuentran recogidos en los nodos del árbol.

Estimación de la biomasa microbiana mediante ATP

La figura 56 muestra los resultados del ensayo de cuantificación de ATP para muestras de todas las áreas de estudio salvo las correspondientes a la colonización superficial de Salar Grande Sur donde no fue posible medirlas debido a que la elevada cantidad de arcillas que presentaban las muestras impedían el paso de luz en el luminómetro. Los valores más altos de biomasa se hallaron en la colonización interior de Salar Grande Sur, $13.4 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$ cels/gr en la zona de colonización, que presentaba prácticamente el doble de células por gramo de porción colonizada que el mismo tipo de colonización (en volumen) presente en Salar Grande Norte ($6.7 \times 10^5 \pm 0.6 \times 10^5$ cels/gr de halita colonizada) que fue la localización que mostró menor biomasa. Las localizaciones que exhibían un patrón de colonización en banda presentaron valores intermedios muy similares entre si, $8.9 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$ cels/gr de zona colonizada en el caso de Llamará y $8.2 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$ cels/gr de zona colonizada en el caso de Yungay.

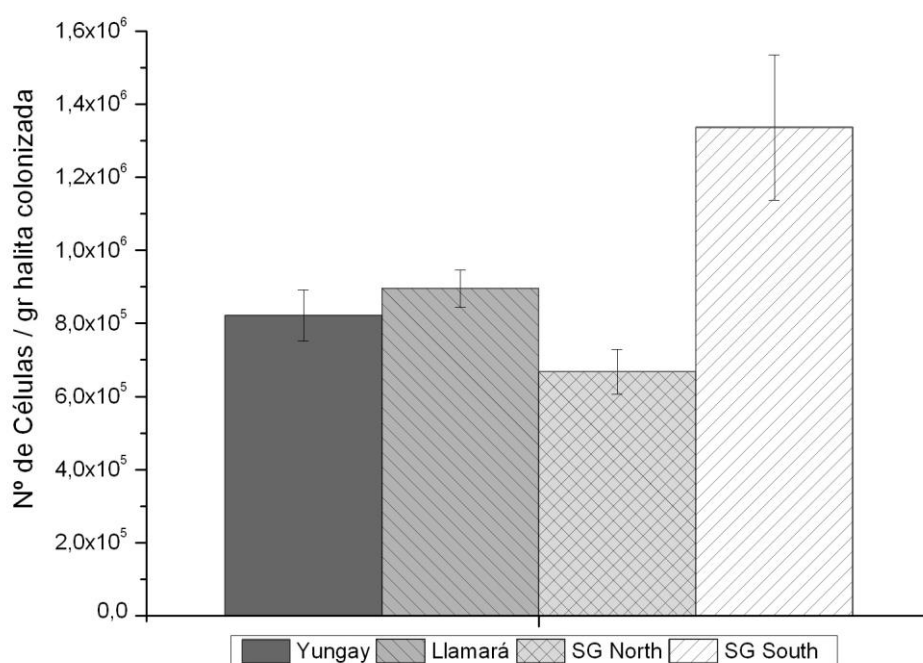


Figura 56. Estimación de la biomasa microbiana presente en los nódulos de halita. La biomasa se expresa en número de células por gramo de la zona de colonización.

Discusión

El desierto de Atacama esta considerado como uno de los lugares más extremos del planeta en relación a su aridez (Weischet, 1975; Ericksen, 1983; Houston y Hartley, 2003; McKay *et al.*, 2003; Hartley *et al.*, 2005; Houston, 2006; Clarke, 2006), la intensa radiación PAR y UV (Piacentini *et al.*, 2003; Cockell *et al.*, 2008; Cordero *et al.*, 2014; Wierzchos *et al.*, 2015), la acusada oscilación térmica y de los niveles de humedad relativa (Dose *et al.*, 2001), así como las condiciones oligotróficas extremas y los elevados niveles de oxidantes inorgánicos y sales en los suelos (Navarro-González *et al.*, 2003). A pesar de estos severos condicionantes, aparentemente incompatibles con la vida, destaca por su singularidad la colonización microbiana de los nódulos superficiales de sal (descritos por primera vez en Wierzchos *et al.*, 2006). Estas rocas (macroeflorescencias) compuestas casi exclusivamente por cloruro sódico (96-99%), y que parecen ser formaciones exclusivas del desierto de Atacama (Stoertz & Erickson, 1974; Artieda *et al.*, 2015), constituyen un microhábitat endolítico único, con características de un ambiente extremadamente seco y un ambiente extremadamente hipersalino, que permite el establecimiento de comunidades de microorganismos basadas en la fotosíntesis en lugares que han llegado a ser catalogados como *el límite seco para la vida fotosintética en la Tierra* (Navarro-González *et al.*, 2003; Wharren-Rhodes *et al.*, 2006; Wierzchos *et al.*, 2006).

Condiciones microclimáticas en el entorno de los nódulos de halita en diferentes áreas de muestreo.

El diseño experimental aplicado en este estudio ha permitido comprobar que, a pesar de que todas las áreas de muestreo se sitúan en el núcleo hiperárido del desierto de Atacama, el cual se caracteriza por su elevada estabilidad climática (Weischet, 1975; Hartley *et al.*, 2005), las condiciones microclimáticas registradas a nivel de suelo, en relación a los patrones de comportamiento diario de la temperatura y la humedad relativa del aire, exhiben diferencias entre las distintas localidades, que podrían estar vinculadas a las peculiaridades geomorfológicas de su entorno.

De forma general, y debido a la práctica ausencia de nubes así como la ausencia de vegetación en los suelos, el comportamiento microclimatológico en la áreas de muestreo podría encontrarse principalmente sometido al balance radiativo y al flujo de calor sensible del suelo (Whitford, 2002; Heusinkveld *et al.*, 2004). Este hecho explicaría la regularidad diaria observada en los registros microclimatológicos obtenidos en este estudio para cada área de muestreo y la elevada oscilación en los valores de temperatura y humedad relativa, que muestran a su vez una fuerte correlación negativa.

En este contexto, y aunque los datos de radiación PAR no permiten establecer la cantidad de total de energía que recibe el suelo, ya que solo constituyen el 45% del espectro de radiación, los registros de densidad de flujo fotónico para el espectro visible (400-700nm) se muestran muy similares entre las localidades de Yungay (interior) y Salar Grande Sur (próxima a la costa), exhibiendo en ambas un predominio de los días despejados. De esta forma, y presuponiendo que en el resto de localizaciones la cantidad de radiación incidente sería similar, el balance total de energía podría quedar reflejado en el valor medio de la temperatura, que en función de los registros mensuales se muestra muy similar en todas las áreas de muestreo. Por otro lado, los sensores de PAR muestran una mayor frecuencia de episodios asociados con brumas, calimas o neblinas en Salar Grande Sur que podría ser debida posiblemente a su proximidad al océano y a que la geomorfología de la Cordillera de la Costa en este área presenta menor altura y que indicarían una mayor influencia de la camanchaca en esta zona (Robinson *et al.*, 2015).

En este sentido, y como consecuencia de la elevada oscilación observada en los valores de temperatura diarios, los valores medios de temperatura obtenidos no constituyen descriptores precisos de la variabilidad en el comportamiento térmico de cada localización siendo por tanto

necesario el desglose en los valores medios de las máximas y de las mínimas. De forma similar, las variaciones de HR quedan mejor explicadas en base a sus valores mínimo y máximo, aunque en este caso los valores de la media mensual y anual de HR podrían estar indicando la carga de humedad neta en cada área. Bajo esta nueva dimensión de las variables, los datos obtenidos parecen indicar que las localidades estudiadas exhiben diferencias en el patrón diario de temperatura y humedad relativa pudiendo agrupar las áreas de muestreo en función de ambos parámetros en tres grandes conjuntos:

Por un lado, la localización de Yungay muestra valores máximos de temperatura elevados, una mayor oscilación térmica y condiciones más áridas, en función de la media de RH y el número de horas acumuladas por debajo del 40% de HR. Atendiendo además a su comportamiento a lo largo del año, el área de Yungay parece estar sometida a una masa de aire distinta del resto de localizaciones, cuyo máximo de humedad tiene lugar a finales del verano austral coincidiendo con los mínimos anuales del resto de localizaciones. Estos resultados sugieren que Yungay presenta mucha menor influencia de las camanchacas (o ninguna) dado que el periodo de mayor frecuencia de eventos de nieblas en Atacama tiene lugar durante los meses de invierno austral (junio-agosto) (Cereceda *et al.*, 2008) y al bloqueo de las masas de aire que provienen del océano como consecuencia de la orografía del entorno de Yungay (en Robinson *et al.*, 2015). Este hecho podría quedar reflejado en la menor frecuencia de días netamente despejados registrados por los sensores de PAR.

En contraposición, y en el otro extremo del gradiente, se encuentra el área de Salar Grande Sur que presenta los mayores niveles de humedad, la menor oscilación térmica y valores máximos de temperatura mucho más reducidos (más de 15 grados de diferencia con Yungay). En este sentido, y como consecuencia de la orografía de la cordillera de la costa que en este área conforma un pasillo de entrada de las masas de aire de la costa, es probable que la climatología de la localización de Salar Grande Sur pudiera asemejarse más a las características del desierto costero, aunque cabe destacar que esta zona no han sido observada la presencia de líquenes epilíticos y/o colonización hipólítica, que son característicos en las áreas costeras donde la presencia de nieblas es constante (Azua-Bústos *et al.*, 2011). Es por ello que esta localidad configure una zona de transición entre el desierto costero y el desierto absoluto.

Por último, se encuentran las localizaciones de Lllamará y Salar Grande Norte que aunque presentan entre si diferencias básicas relacionadas con su distancia a la costa como es la temperatura mínima y la oscilación térmica, en términos generales en relación a los máximos de

temperatura y niveles de humedad media, se muestran muy similares entre si y manifiestan condiciones intermedias entre Yungay y Salar Grande Sur.

Los nódulos de halita como sustrato para la colonización endolítica.

Captación de agua por los nódulos de halita.

En los ambientes más hostiles de la Tierra los microhábitats endolíticos ofrecen condiciones ambientales que a modo de refugio salvaguardan a los microorganismos de aquellos factores que son limitantes para su establecimiento (Wierzchos *et al.*, 2012a; Karsten & Holzinger, 2014; De los Ríos *et al.*, 2014a). Como en otros desiertos, en núcleo hiperárido del desierto de Atacama el principal factor limitante para la vida es la obtención de agua (Bhatnagar & Bhatnagar, 2005; Wierzchos *et al.*, 2012a), siendo especialmente determinante para las comunidades litobióticas dominadas por cianobacterias que requieren agua líquida o niveles de humedad relativa por encima del 93% para el desarrollo de su actividad metabólica (Lange *et al.*, 1994, 2001; Schlesinger *et al.*, 2003; Wharren-Rhodes *et al.*, 2006). A pesar de que en las regiones más secas se han llegado a describir precipitaciones y/o eventos de niebla y rocío ocasionales (McKay *et al.*, 2003), los datos recogidos en las áreas incluidas en este estudio han mostrado que durante el periodo de medida no se registró ninguna precipitación o formación de rocío a nivel de suelo. Es por ello que las únicas posibles fuentes de agua en el ambiente, lo constituyen las nieblas, tal y como ocurre en otros desiertos (Kidron, 2002; Ninari & Berliner, 2002; Veste *et al.*, 2008; Büdel *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2009) o regiones de Atacama (e.g. Azúa-Bustos *et al.*, 2011), o valores elevados de la humedad del aire.

En este escenario, y a diferencia de otros sustratos líticos, los nódulos de halita no solo actúan como elemento de refugio sino que desempeñan un papel activo en la captación y retención de agua procedente de la humedad del aire y las nieblas a través de su estructura (microporosidad, Wierzchos *et al.*, 2012b) y las características físico-químicas (propiedades higroscópicas, Wierzchos *et al.*, 2006; Davila *et al.*, 2008) constituyéndose como los primeros elementos facilitadores que permiten el establecimiento y supervivencia de comunidades microbianas fotosintéticas en lugares del desierto donde apenas se han registrado precipitaciones en décadas (McKay *et al.* 2003).

Los registros obtenidos en este trabajo acerca de las condiciones microclimáticas internas de los nódulos de Yungay y Salar Grande Sur han mostrado que de forma general mientras en el exterior de los nódulos las condiciones pueden llegar a ser extremadamente secas, en el interior se mantienen niveles de humedad relativa elevados y por encima del umbral de deliquesencia que han podido ser vinculados, a través de los datos obtenidos por los sensores de conductividad eléctrica (CE), con la presencia de agua líquida. Estos datos han sido corroborados por los análisis mediante LT-SEM en los que se ha mostrado que el agua en el interior de los nódulos forma una salmuera saturada de NaCl. Este hecho es particularmente relevante en el caso del área de Yungay, cuyos valores de RH externos mensuales y anuales (media, máxima, mínima y n° de horas $RH < 40\%$) obtenidos en este trabajo la sitúan como la localidad más seca, y que ha sido catalogada como el *límite seco para la vida fotosintética en la Tierra* (Navarro-González *et al.*, 2003; Wharren-Rhodes *et al.*, 2006; Wierzechos *et al.*, 2006). En el interior de los nódulos de esta localidad la presencia de agua líquida tiene lugar durante el 66,24 % del periodo de medidas (2432 horas por encima del umbral de deliquesencia $HR > 75\%$ respecto 3672 horas registradas. $2918 \text{ h}^{-1}/3672 \text{ h}^{-1}$ si se atiende a los datos de CE).

La comparación realizada en este estudio de los valores registrados en el interior de los nódulos de Yungay frente a los obtenidos en el interior de los nódulos de Salar Grande Sur, han permitido, a su vez, detectar diferencias en el comportamiento interno de la humedad relativa en los nódulos que pueden estar influidas por las condiciones microclimáticas externas. De esta forma, en el caso de Salar Grande Sur, cuyas condiciones microclimáticas la sitúan como la más húmeda, se registró la presencia de agua líquida constante en el interior de los nódulos durante todo el periodo de medidas. Este comportamiento podría ser consecuencia de que prácticamente a diario en el exterior la humedad alcanza valores superiores al umbral de deliquesencia ($HR > 75\%$) y al escaso número de días por debajo del umbral de eflorescencia ($HR < 40\%$), que mantiene la humedad en torno a los nódulos dentro del intervalo metaestable (marcado en la Fig.18 en Antecedentes) la mayor parte del tiempo. Esta conjunción de factores junto con los valores más reducidos de temperatura y oscilación térmica, así como la escasa variación de la temperatura entre el interior del nódulo y el exterior, configuran un escenario extremadamente estable que puede ayudar al mantenimiento de la humedad dentro del nódulo y a reducir la pérdida de agua por evaporación. En cambio en Yungay, los bajos niveles de humedad relativa junto con los altos valores máximos de temperatura y la elevada oscilación térmica registrados en el exterior podrían explicar la aparición de eventos secos (aquellos en los que se produce una

pérdida de humedad en el interior llegando a equilibrarse con la humedad de la masa de aire en superficie) en el interior de los nódulos.

A su vez, la aparición de eventos secos en Yungay ha permitido analizar la dinámica de captación de humedad en los nódulos de halita (Fig. 38). Este proceso puede ser analizado en tres etapas:

La primera constituiría una etapa en la que el nódulo se seca tras un periodo sostenido con agua líquida en su interior y niveles de humedad relativa en torno al 75%, como cabría esperar de una salmuera de NaCl saturada y en equilibrio. En este caso, se ha sugerido que estos periodos comienzan cuando la HR exterior no supera el 40% (Wierzchos *et al.*, 2012b) y que explicaría la ausencia de episodios secos en Salar Grande Sur. Tras esto el interior del nódulo tiende a equilibrarse con el ambiente exterior mostrando valores mínimos y máximos similares. Esta etapa puede tener una duración variable, de entre 2 a 7 días en los datos registrados en este estudio, durante la cual no se registra ninguna actividad en los sensores de CE tanto internos como externos.

La segunda etapa, la de captación de agua, se puede subdividir en dos fases, una inicial, y que supone el detonante del proceso, que se produce por la noche cuando la humedad relativa externa asciende por encima del 55% y siempre que los sensores de CE externos detectan agua líquida en el exterior. En este caso, en el que no se alcanzan niveles de HR de delicuescencia y excluida la deposición por contacto dado que la temperatura del nódulo no desciende por debajo de la temperatura de rocío de la masa de aire del ambiente circundante, el proceso podría estar dominado del papel que puede desempeñar la nanoporosidad en la modificación de umbral necesario para alcanzar delicuescencia permitiendo obtener agua líquida en valores cercanos al 55% así como sus efectos capilares en la retención de agua (Benavente *et al.*, 2003; Wierzchos *et al.*, 2012b). No se descarta que la presencia de arcillas tipo illita en la costra externa del nódulo puedan desempeñar algún papel en la facilitación de la captación de agua a baja humedad relativa en esta fase (véase Agam & Berliner, 2006 y referencias en su interior). Durante toda esta fase la humedad en el interior del nódulo aumenta sin que se registre actividad en el sensor de CE interno. La segunda fase de esta etapa comienza a la salida del sol cuando empieza detectarse agua líquida en el interior correlacionada con una drástica disminución de la conductividad eléctrica en el exterior (que pudiera ser indicativo de entrada de agua y nutrientes depositados en la superficie hacia el interior del nódulo). En esta etapa, la HR dentro del nódulo continúa aumentando hasta alcanzar el umbral de delicuescencia (75%) cuando en el exterior se produce

una rápida disminución de la humedad ambiental. A su vez, se produce un incremento de temperatura interna por encima de la temperatura externa que puede tener dos efectos, por un lado es esperable un aumento de la presión interna del nódulo que justificaría los elevados niveles de humedad absoluta (puesto que su cálculo está definido en base a la presión atmosférica) y que puede provocar el movimiento neto de agua de dentro hacia fuera produciendo a posteriori las eflorescencias en superficie (Fig. 39). Por otro lado, se observa que justo en el momento que se alcanza el umbral de deliquesencia, la temperatura externa de la roca se encuentra por debajo del punto de rocío de la masa de aire interna de la roca lo cual podría favorecer la condensación de agua en la superficie del nódulo frente a procesos de evaporación. Estos dos efectos podrían explicar el segundo pico de CE detectado en la superficie de los nódulos de halita.

La última etapa sería la del mantenimiento de la humedad en el interior que depende de la carga de agua inicial, que permita mantener humedad suficiente a lo largo del día, y que la humedad relativa durante las noches subsiguientes vuelva a ascender por encima del 55%. Durante esta fase se observa la dinámica de dobles picos en los sensores de voltaje exterior, que en los casos en los que la HR externa llega alcanzar valores cercanos a deliquesencia pueden llegar a solaparse.

Estructura porosa de los nódulos de halita.

A diferencia de otros ambientes líticos, los fenómenos de captación y pérdida de agua convierten a los nódulos superficiales de halita en un sustrato dinámico que, a través de sucesivos episodios de disolución y reprecipitación de sales, se encuentra en continuo crecimiento y transformación. En este contexto, la estructura porosa de la roca va a encontrarse condicionada por aquellos elementos que influyen en la velocidad de cristalización, como son el grado de hidratación y la velocidad de evaporación, que dependen a su vez de la humedad relativa del aire, de la temperatura y la acción del viento, siendo por tanto responsables en última instancia de la doble estructura que presentan los nódulos y que pueden explicar las ligeras diferencias en la estructura porosa de los nódulos entre localizaciones (véase modelo sugerido en Artieda et al., 2015).

De forma general en todos los nódulos se forma en superficie una capa de menor porosidad y poros más pequeños como consecuencia de los procesos de evaporación de agua y formación de eflorescencias de NaCl en la superficie de los nódulos. Debido a la mayor oscilación térmica, las

temperaturas máximas alcanzadas a diario y el valor mínimo de HR diario, que se alcanza en las localizaciones de interior, Yungay y Llamara, este proceso de cristalización se produce con más frecuencia cuya repercusión es la formación de una gran estructura densa y poros de muy pequeño tamaño. En esta capa densa se pueden desarrollar los fenómenos de condensación capilar descritos en Wierzchos y colaboradores (2012b) y puede proteger frente a las pérdidas de humedad del interior de nódulo. En cambio, en todos los nódulos, el interior muestra mayor grado de porosidad y poros de mayor tamaño. Las diferencias observadas en el grado de porosidad entre las distintas localidades podrían estar en estrecha relación con los niveles medios de humedad alcanzados en cada localización mientras que el diámetro podría vincularse a los periodos en los que se presenta agua líquida constante en el interior del nódulo. En Yungay y Llamara se observa una región de interfase entre ambas estructuras, que se ajusta de forma laxa a lo descrito en el modelo propuesto por Schenk y Urai (2004) durante los procesos de recristalización de salmueras y que podría configurar una región donde se acumulan las fases fluidas.

Los nódulos de halita como captadores de nutrientes.

Dada las condiciones oligotróficas del sustrato detectada por microanálisis por difracción de rayos X y los análisis químicos y mineralógicos, queda abierto el interrogante sobre cuál podría ser la principal fuente de aporte de nutrientes esenciales al sistema. En este sentido en el desierto de Atacama, como en otros ecosistemas áridos, las nieblas y el polvo pueden constituir importantes entradas de solutos inorgánicos a estos sistemas (Ridame & Guieu 2002; Herut *et al.*, 2002; Okin *et al.*, 2004; Ewing *et al.*, 2009). Los estudios de Rech y colaboradores (2003) y González y colaboradores (2011) han demostrado que los aerosoles marinos y las camanchacas constituyen una fuente de nutrientes sobre todo de nitratos y fosfatos en el Norte Grande de Chile. Las cuantificaciones realizadas por Schemenauer y Cereceda (1992) en la región de Coquimbo ofrecen valores de la concentración de solutos en las nieblas de 9,12 mg/L de SO_4^{-2} , 0,8 mg/L NO_3^- , 1,8 mg/L Cl^- , 4,81 mg/L Na^+ , 0,37 mg/L K^+ , 0,96 mg/L Ca^{+2} y 0,68 mg/L Mg^{+2} mientras que el estudio González y colaboradores (2011) exhibe en función de la localización de muestreo valores de nitrógeno total en torno a los 3-11 mg/L y 0,1-0,6 mg/L de PO_4^{-3} en regiones próximas a Iquique. Los datos ofrecidos por Rech y colaboradores (2003) sobre los niveles isotópicos de $\delta^{34}\text{S}$ sugieren a su vez un gradiente de deposición de solutos en función de la distancia a la costa e indican la posible influencia de las deposiciones derivadas de la evaporación de aguas subterráneas en localizaciones donde se observan tablas de agua cerca de la superficie,

sobre todo en relación al Ca, el S, y otras sales. En este escenario, la morfología de los nódulos junto con sus propiedades higroscópicas pueden favorecer la captación de nutrientes al actuar como colector de nieblas ya sea por intercepción al paso de esta, al incrementar la relación superficie/volumen y, tomando los salares a mayor escala, al suponer una superficie rugosa que puede generar flujos de aire turbulentos que favorecen la deposición. En relación a estos fenómenos cabría suponer que los minerales de arcilla en superficie podrían desempeñar un papel importante en la retención de nutrientes y en la formación de complejos de intercambio catiónico (Carroll, 1959; Stotky, 1966; Agam & Berliner, 2006).

Ambiente lumínico en el interior de los nódulos de halita

Garantizada la presencia de agua líquida, otro de los factores limitantes en el desierto de Atacama lo constituye la intensa radiación solar y la elevada cantidad de radiación UV que, junto a la desecación, limitan la viabilidad de la células microbianas e incluso de distintas formas de resistencia (Piacentini *et al.*, 2003; Cockell *et al.*, 2008; Cordero *et al.*, 2014; Wierzchos *et al.*, 2015). Este hecho, se muestra particularmente relevante en el caso de organismos fotosintéticos, en el que valores elevados de ambas variables pueden causar la fotoinhibición de los fotosistemas, daños en el aparato fotosintético incluidos los tilacoides, daños en el ADN así como un incremento del estrés oxidativo celular (Herrmann *et al.*, 1997; He & Häder, 2002; Wynn-Williams & Edwards, 2002; Han *et al.*, 2003; Harel *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2007).

En esta situación, los nódulos de halita han mostrado una elevada capacidad para filtrar la mayor parte de la radiación UV a través de los primeros mm de la roca, que se ve reducida, en los nódulos de Yungay, entre un 95-99% justo por encima de la zona de colonización, permitiendo al mismo tiempo la transmisión de entre un 4-5% del total de radiación PAR con la roca seca, siendo este el estado más sensible al daño por radiación para los microorganismos. El modelo establecido por Nienow y colaboradores (1988) postula, además, que la presencia de agua en ambientes criptoendolíticos puede modificar la reflectividad y transmisión de luz incrementando el flujo fotónico en casi un orden de magnitud. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el incremento en la transmisión de la radiación PAR que se produce en los nódulos de Yungay cuando están húmedos es de casi dos veces y media, mientras que en los nódulos de Salar Grande el incremento que se produce es casi el triple respecto a la radiación transmitida en

estado seco. De esta forma, la radiación PAR disponible para las comunidades microbianas es de unos 300 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los nódulos de Yungay a unos 6mm de profundidad y de 150 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en los nódulos de SG a unos 9mm de profundidad cuando la intensidad de la radiación incidente sobre la superficie del nódulo es igual a la máxima intensidad detectada en Atacama (2400 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estos datos ampliarían considerablemente el rango de profundidad de la zona apta para la colonización por microorganismos fototróficos de 2mm en costras de NaCl propuesto por Cockell y Raven (2004), a partir de ensayos de laboratorio realizados en placas que establecían el límite teórico de radiación para realizar la fotosíntesis (0,1 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A este respecto es importante resaltar, que en función de la calidad de luz, el nódulo permite mayor transmisión de las radiaciones de mayor longitud de onda viéndose aumentado considerablemente el margen de captación de luz en torno al pico máximo de absorbancia del fotosistema II de la clorofila a, que se compone de pigmentos accesorios ficocianinas (abs max =610-630 nm) y aloficocianinas (abs max = 650-670 nm), y clorofila a (abs max = 665-680 nm). Por otro lado, también se debe tener en cuenta que en las muestras analizadas la colonización ocupaba espacios más profundos en el nódulo, hasta casi los 20 mm en Yungay y los 25mm en Salar Grande pudiéndose estar realizando una infraestima sobre la cantidad de luz en los nódulos y que podría postular a los nódulos de halita como el segundo sustrato que permite el mayor paso de luz tras la nieve (Berner & Evenari 1978; Matthes *et al.*, 2001; Schlesinger *et al.*, 2003 Cockell & Raven, 2004; Hall *et al.*, 2008). En este sentido, esta hipótesis podría ser explicada como consecuencia de la propia estructura de los nódulos que por su forma y composición pudieran actuar como un colector de luz, canalizando toda la radiación recibida en superficie hacia el interior del nódulo dispersándose entre los microcristales de NaCl.

Con independencia de las capacidades del sustrato para atenuar el exceso de radiación ambiental, las comunidades microbianas presentes en los nódulos podrían estar adaptadas a ambientes de elevada radiación, tal vez como respuesta al tiempo de exposición a la radiación que alcanza la zona de colonización o por el carácter dinámico de los nódulos que al disolverse pueden dejar expuesta a la comunidad. En este sentido se ha detectado que en las cubiertas de las células de la cianobacteria presente en las halitas existe un pigmento que ha sido identificado como escitonemina (Vitek *et al.*, 2010; 2012; 2014). Este compuesto es un pigmento lípido-soluble altamente estable que se acumula en las cubiertas celulares que actúa como pantalla contra la radiación UV (absorción máxima 360nm) el cual es producido exclusivamente por ciertas cianobacterias incluido el género *Chroococidiopsis*, aunque no ha sido descrito en *Euhalothece*, que para el mismo fin sintetiza aminoácidos de tipo micosporina (Proteau *et al.*,

1993; Ehling-Schulz *et al.*, 1997; Garcia-Pichel, 1998b; Dillon & Castenholz, 1999; Ehling-Schulz & Scherer, 1999). En el trabajo de Vitek y colaboradores (2010) se muestra como los organismos del área de Yungay, cuya zona de colonización se sitúa más próxima a la superficie, acumulan mayor cantidad de escitonemina, mientras que los organismos de Salar Grande, que se sitúan en zonas más profundas y que tal vez reciban luz reflejada del suelo en lugar de radiación directa (por la posición que ocupa la colonización en algunos nódulos), sintetizan mucha menor cantidad. Esta diferencia corroborada y explicada en los posteriores trabajos de Vitek y colaboradores (2012; 2014) ha sido descrita como una compleja respuesta en la que intervienen la cantidad de radiación UV-A y la temperatura que presentan una correlación positiva con la producción de escitonemina frente a la salinidad que inhibe la producción de esta. Es por ello que el gradiente de pigmentación observado entre las diferentes áreas de estudio se encuentre en consonancia con los máximos de temperatura diaria alcanzados en cada localidad así como la carga neta de humedad (expresada en número de horas por encima del 55% de HR), así como la frecuencia y duración de episodios secos que regulan la presencia de salmuera en el interior de los nódulos. Por otro lado la elevada cantidad de este pigmento, resulta llamativa en función del coste en términos de energía que puede suponer para la célula su síntesis, en concreto en los nódulos de Yungay donde se ha sugerido que los niveles de actividad microbiana podrían ser muy reducida (Ziolkowsky *et al.*, 2013). Es por ello que esta acumulación de escitonemina podría estar reflejando a su vez por un lado el grosor de las cubiertas, lo que explicaría la correlación observada en las muestras de esta tesis entre el grosor y el grado de pigmentación entre localidades de estudio, y por otro la edad de las células (Pentecost, 1993). Además, la mayor cantidad de escitonemina en Yungay podría llegar a suponer, en este área con menor influencia y aportes de la camanchaca, un almacenamiento de nutrientes, sobre todo de nitrógeno que suele constituir un nutriente limitante en los desiertos (Pointing & Belnap, 2012). Cabe mencionar a su vez, que los organismos halófilos e hiperhalófilos, con los cuales se han relacionado algunos de los microorganismos asociados a las cianobacterias, se encuentran entre los organismos más radiotolerantes que se conocen, presentando complejos sistemas de reparación de daños frente a la radiación, múltiples copias de ADN, e incluso producen pigmentos carotenoides como respuesta a la excesiva radiación visible y UV (Asgarani *et al.*, 1999; Oren & Rodríguez-Valera, 2001; Antón *et al.*, 2002; McCready & Marcello 2003; Kish *et al.*, 2009; Kish & DiRuggiero, 2012; Jehlička *et al.*, 2013). En este sentido la detección de carotenoides en los trabajos de los Vitek y colaboradores (2010; 2014) podrían mostrar estrategias de la comunidad de heterótrofos.

Posibles periodos para realizar la fotosíntesis en el interior de los nódulos de halita.

Como se ha visto, las condiciones microclimáticas en el interior de los nódulos aportan los niveles básicos necesarios de luz y agua líquida para que la cianobacteria presente en ellos pueda realizar la fotosíntesis (Lange, 1993; 2001). En este sentido, en el área de Salar Grande Sur la presencia continuada de agua líquida, la disposición de la colonización en zonas más internas de la roca (donde la intensidad lumínica es menor) así como el menor contenido de escitonemina en las cubiertas de las cianobacterias en esta localidad, sugiere que los productores primarios han podido desarrollar la fotosíntesis durante todo el periodo de medidas y, presumiblemente, se han visto expuestos a menos condiciones fotoinhedoras. Es por ello, que las cianobacterias habrían podido canalizar muchos más recursos (incluidos los que en otra situación se destinarían a la secreción de escitonemina) hacia la división celular y producir agregados más grandes y con mayor número de células.

Por otro lado, en la localidad de Yungay, que constituye el área más seca de todas las muestreadas, y posiblemente una de las más secas de la Tierra (McKay *et al.*, 2003), donde se ha calculado que en superficie sólo se dan las condiciones para realizar la fotosíntesis durante 75 ± 15 horas al año (Wharren-Rhodes *et al.*, 2006), los nódulos han permitido, durante el periodo de medidas (de 25 de enero de 2010 a 26 de junio de 2010), 1305,5 horas en las que la humedad del interior superaba el 75% (1524.5 si se atiende a datos de CE) y se registraba luz en superficie, lo que constituye un 35.55% del tiempo total registrado. A pesar del gran porcentaje de tiempo en el que puede realizar la fotosíntesis, en los nódulos de esta localidad, se ha observado mediante las distintas técnicas de microscopía un menor desarrollo de los agregados y mayores cantidades de escitonemina, lo que posiblemente, y debido a mayor la cantidad registrada de radiación transmitida en la zona de colonización, podría sugerir un mayor estrés fotooxidativo.

En este contexto, Dávila y colaboradores (2013; 2015) han mostrado, tanto en ensayos de laboratorio, como *in situ*, que las cianobacterias presentes en los nódulos son capaces de una rápida activación de su aparato fotosintético cuando se alcanzan los niveles de deliquesencia, que como se observa en los datos presentados en esta tesis estos niveles se alcanzan casi al amanecer. El trabajo de Dávila y colaboradores (2015) exhibe además como la actividad de los fotosistemas declina en torno a las 4 de la tarde y que las cianobacterias de Salar Grande no muestran signos de fotoinhibición, aunque los datos de radiación PAR ofrecidos para la zona de colonización en este trabajo (0,02% de la radiación incidente total) son sustancialmente menores que los ofrecidos en esta tesis (en torno al 6% a 9mm de la superficie y la roca húmeda). Este

hecho podría estar indicando que sus mediciones se han realizado en zonas más profundas de los nódulos.

Colonización microbiana de los nódulos de halita.

Patrones de colonización

En casi todos los habitats criptoendolíticos puede considerarse que es la cantidad y calidad de la luz que puede penetrar a través del sustrato la luz uno de los principales factores que estructura y organiza las comunidades microbianas (Matthes *et al.*, 2001; Walker & Pace, 2007^a; Cámara *et al.*, 2014; Wierzechos *et al.*, 2015). En distintos hábitats criptoendolíticos presentes en desiertos se ha descrito como la colonización endolítica se dispone formando bandas, en algunos casos de diferente pigmentación, que evidencian una segregación espacial en algunos casos de diferentes fotótrofos como respuesta a la longitud de onda que atraviesa cada capa o en otros la circulación de nutrientes entre fotótrofos y heterótrofos (e.g. Friedmann, 1982; Ruissi *et al.*, 2007; Wierzechos *et al.*, 2011; 2015; De los Ríos *et al.*, 2014a).

En el caso de la colonización de los nódulos de halita, y como se ha mencionado anteriormente, los organismos con mayor cantidad de escitonemina tienden a situarse en las regiones más próximas a la superficie coincidiendo con lo descrito en Vitek y colaboradores (2012; 2014). Sin embargo, considerando las diferencias en el grado de pigmentación como una respuesta fisiológica consecuencia de su exposición a la radiación UV que supone un gasto energético para la cianobacteria (Vitek *et al.*, 2014) y habiendo sido observado que los agregados de cianobacterias y microorganismos heterótrofos asociados, que conformarían la unidad funcional básica, pueden posicionarse a distintas profundidades en el interior de los nódulos, sugiere que estos no parecen estructurarse sólo en respuesta a rangos óptimos de radiación. En este sentido, atendiendo a los datos registrados del comportamiento de la humedad en el interior de los nódulos de Yungay y Salar Grande Sur y asumiendo el modelo descrito por Schenk y Urai (2004) para la configuración porosa de los nódulos, podría sugerirse que los patrones macroscópicos de colonización pudieran ir asociados a la existencia de zonas de acumulación de agua en los nódulos y a la que la radiación incidente llegue de orientaciones menos homogéneas (por ejemplo reflejada en el suelo). Bajo esta hipótesis, en los casos de Yungay y Llamará en los que la colonización más frecuente se presenta en forma de banda, los organismos podrían tender a acumularse en la zona de interfase entre las dos regiones texturales del nódulo que es donde se

concentran las fases fluidas en un equilibrio entre absorción y evaporación (Schenk y Urai, 2004). Además teniendo además en cuenta los aumentos de presión propuestos en este estudio y que impulsarían un movimiento de la salmuera de dentro a fuera un síntoma de este equilibrio entre la entrada y salida de agua podría estar constituido por la línea de acumulación de arcillas en Yungay y Lllamará. En cambio en la colonización en volumen, que se produce en Salar Grande, donde parece que los nódulos pueden presentar agua de forma constante y que la temperatura y la oscilación térmica son más moderadas, lo que podría suponer una menor evaporación, el agua podría repartirse por toda la roca y hacia el interior, empujada por la gravedad. Esto queda reflejado en que con más frecuencia las eflorescencias en estos nódulos, sobre todo en Salar Grande Sur, tienden a aparecer en las zonas basales como respuesta a un goteo. Por otro lado, y de nuevo bajo el modelo de Schenk y Urai (2004), puede llegar a pensarse que la disposición de los agregados pudiera estar relacionada a su vez con las zonas de triple unión por las que circula el agua, aunque en este sentido sería conveniente un estudio más exhaustivo acerca de la porosidad conectada. El caso de la colonización en banda en Salar Grande Sur, podría responder a que la capa de arcillas solo se extiende en los primeros milímetros e impide el paso de luz obligando a los organismos a ubicarse muy cerca de la superficie.

Diferencias en los valores de biomasa.

En cuanto a la cantidad de microorganismos detectada en los diferentes nódulos de halita, los resultados obtenidos mediante el kit comercial exhibieron por lo general un bajo número de células por gramo de zona colonizada en todas las localizaciones en comparación con valores registrados mediante esta técnica en otros hábitats endolíticos presentes en Atacama (Wierzbos *et al.*, 2013) o en otros ecosistemas extremos como en los Valles Secos de la Antártida (Cowan *et al.*, 2002) y se encuentran dos índices de magnitud por debajo de las estimaciones realizadas por Robinson y colaboradores (2015) mediante conteos directos con DAPI. Esta menor abundancia puede quedar explicada en base a tres argumentos. Por un lado la determinación de ATP suele reflejar la parte viable y activa del total de la biomasa (Lundin, 2000) es por ello que habiendo sido observada la presencia de organismos senescentes o inactivos (Roldan *et al.*, 2014), una fracción de ellos no produzca ATP. Por otro lado como se ha sugerido anteriormente el grado de actividad y la capacidad metabólica de los microorganismos en los nódulos puede ser reducido, este hecho unido al tamaño medio de las células observadas hace esperable que la cantidad de ATP por célula sea considerablemente menor que el de una célula de *E. coli* en cultivo que es la

única cifra que se utiliza como referencia en el kit comercial. Por último, y aunque los ensayos se realizaron contraponiendo todas las mediciones en relación a un estándar de concentración conocida de ATP, la elevada cantidad de sal puede interferir en el rendimiento de la luciferasa (DeLuca *et al.*, 1979) disminuyendo la intensidad de la reacción fluorescente lo cual puede suponer una infravaloración de la señal luminosa tanto de la muestra como del estándar.

Entendiendo que las limitaciones en la estimación cuantitativa afectan por igual a todas las muestras, en este estudio cobra mayor relevancia el análisis comparativo. En este sentido, en la localización de Salar Grande Sur, en la que se observaron los agregados más grandes, el número de células por gramo de zona colonizada es casi un índice de magnitud mayor que los registrados en el resto de localidades. Esta mayor abundancia de biomasa puede ser un reflejo de las condiciones microclimáticas extremadamente estables registradas en esta localización, tanto en el exterior como en el interior de los nódulos, así como la posible mayor influencia de las *Camanchacas* y las masas de aire marinas en relación a la geomorfología de la zona.

Por otro lado, la menor abundancia de organismos detectada en Salar Grande Norte en comparación con los datos registrados en Lllamará, siendo las dos localizaciones que presentan la mayor similitud en cuanto estructura de comunidad y condiciones generales de humedad relativa y temperatura, podría quedar explicada en función de la densidad de colonización observada siendo esta menor por gramo de muestra en Salar Grande Norte.

Cabe mencionar que el estudio de Robinson y colaboradores (2015) parece indicar que el grueso de la biomasa en Salar Grande podría ser soportado por los organismos heterótrofos a diferencia de lo que sucedería en Yungay donde es la cianobacteria la que conforma la mayor parte de la biomasa.

Cómo se organizan las comunidades microbianas en el interior de los nódulos.

Como en la mayoría de los ambientes naturales, los microorganismos suelen presentarse adheridos a superficies formando complejas asociaciones entre los elementos bióticos y abióticos del sistema en forma de biofilm (Davey & O'toole, 2000; De los Ríos *et al.*, 2003). En el caso de los nódulos de sal, en todas las áreas de muestreo, la unidad básica de organización de colonización microbiana está compuesta por agregados celulares de tamaño variable, compuestos por células por cianobacterianas a las cuales se asocian distintas agrupaciones de bacterias no

fotosintéticas y arqueas, que se disponen en el interior de los nódulos ocupando espacios entre los cristales de sal. A esta organización básica se suma la presencia de un alga eucariota en las dos localizaciones de Salar Grande (De los Ríos *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2015). Los estudios mediante LT-SEM muestran como en estos espacios, los agregados microbianos se encuentran embebidos en la salmuera intersticial (Wierzchos *et al.*, 2012b) y con frecuencia asociados a espacios con aire que podrían facilitar el intercambio gaseoso, dado que en los medios con elevada concentración de sales presentan menor capacidad de disolución de gases atmosféricos (Javor, 2012).

A tenor de los resultados de los análisis mediante microscopia de fluorescencia y TEM, los microorganismos que forman parte de los agregados se asocian fuerte e íntimamente entre sí, en muchos casos posiblemente a través de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), permitiendo a los agregados mantener su forma incluso después de la disolución de los nódulos. En este sentido, la producción de EPS está considerada como una importante estrategia adaptativa en las comunidades litobióticas que podría permitir por un lado la adsorción de agua, tanto de fase líquidas como en forma de vapor, y por otro actuando a modo de esponja reteniendo el agua adsorbida (De los Ríos *et al.*, 2003; 2014a). Estas propiedades podrían extender los periodos metabólicamente activos, particularmente para realizar la fotosíntesis que es un proceso susceptible a la inactivación en condiciones de desecación (Schelesinger *et al.*, 2003). La presencia de EPS en las comunidades endolíticas de los nódulos de halita podría conllevar en concreto a minimizar el contacto de la cianobacteria al medio salino ya que reduce la superficie expuesta. A su vez los EPS podrían facilitar la asociación con arqueas y bacterias adaptadas a vivir a elevadas cantidades de sal y que podrían estar interactuando física y bioquímicamente con la cianobacteria facilitando la supervivencia y actividad de ambos grupos de organismos. Este tipo de consorcios conformados por cianobacterias y microorganismos heterótrofos son muy comunes en ambientes en los que los microorganismos actúan como primocolonizadores y, a menudo, los únicos constituyentes bióticos en ambientes extremos terrestres y acuáticos (Paerl *et al.*, 2000), siendo a su vez una pauta regular en los sistemas litobióticos (Friedmann 1980; Golubic *et al.*, 1981; Walker & Pace, 2007a; De los Ríos *et al.*, 2007; Wierzchos *et al.*, 2012a).

Diversidad microbiana de los nódulos de halita.

Del mismo modo que sucede en otros ambientes hipersalinos que se encuentran próximos a la saturación, las comunidades presentes en el interior de los nódulos de sal se encuentran dominadas, a nivel de riqueza de especies, principalmente por organismos pertenecientes al dominio *Archaea* (Benlloch *et al.*, 1996; Oren, 1994; Ventosa, 2006). De los 16 filotipos obtenidos, 14 se encuentran incluidos dentro de la familia *Halobacteriaceae* que se compone, casi en su totalidad, por microorganismos heterótrofos aerobios que requieren como mínimo una concentración de sal de 1,5 M para su desarrollo y presentan, como adaptación a las elevadas cantidades de sal, la estrategia *salt-in* que es menos costosa en términos de energía (Oren, 1999; 2006; 2011c; Grant *et al.*, 2001).

Si bien, la mayoría de OTUs encontrados en los nódulos de sal parecen constituir especies nuevas, las mayores similitudes con organismos conocidos se dieron dentro de la familia *Halobacteriaceae* con los géneros *Halosimplex*, *Natronomonas*, *Halorussus*, *Halovivax*, *Halovenus* y *Halococcus*. Estos géneros se caracterizan por presentar óptimos de crecimiento a elevadas concentraciones de sal y temperaturas por encima de los 30 °C, algunos en torno a los 45 °C (Oren 2011b; Kanekar *et al.*, 2012). Sin embargo, y a diferencia del estudio anterior por De los Ríos y colaboradores (2010) y lo descrito recientemente por Robinson y colaboradores (2015), los datos obtenidos en esta tesis no reflejan la presencia de ningún OTU relacionado con el género *Halococcus* en la localización de Yungay. Esta discrepancia podría ser debida a problemas durante la extracción de ADN debido a que este género es conocido por la rigidez de su pared celular y suele ser pasado por alto si la extracción no es lo suficientemente agresiva (Kandler & König, 1998, Leuko *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que, dada la dificultad del establecimiento de una filogenia adecuada para el orden *Halobacteriales* (Papke *et al.*, 2011, Oren, 2014) debido a la naturaleza extremadamente conservada de la secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal entre miembros próximos de algunos géneros dentro de este grupo (Asker & Ohta, 2002, Papke, 2009), la frecuencia de procesos de recombinación intragénica e interespecífica (Boucher *et al.*, 2004) y que en algunos géneros como *Halomicrobium*, *Halosimplex*, *Halobaculum*, *Haloarcula* y *Natrinema* se ha detectado la presencia de distintos operones parálogos de ARN ribosomal, cuyas divergencias en secuencia pueden superar el 6 % (López-López *et al.*, 2007), los datos obtenidos en este estudio han de ser tomados con cautela y sugieren la necesidad de un estudio más exhaustivo que incluya secuencias más largas y otros marcadores moleculares (Papke *et al.*, 2011, Boucher *et al.*, 2004).

Por otro lado, es destacable que dos de las secuencias de arqueas obtenidas en el interior de los nódulos de las dos localidades de Salar Grande, parecen posicionarse en la raíz de la que derivan los grupos de *Thermoplasmatales* y muestran correspondencias muy laxas con un organismo denominado *Aciduliprofundum* sp el cual ha sido posicionado dentro de *Euryarchaeota* pero conformando posiblemente una nueva clase dentro del filo (Reysenbach *et al.*, 2006). Blank (2009 y 2009b) lo sitúa en un linaje muy antiguo (paleoproterozoico) de arqueas entre *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*. Este microorganismo acidotermófilo se encuentra presente en el entorno de chimeneas hidrotermales y está catalogado de interés biotecnológico por ser la primera arquea en la que se detecta la capacidad de producir agentes antibacterianos (visto en Catchpole & Poole, 2014). Secuencias asociadas con este organismos han sido también descritas en otros ambientes hipersalinos (e.g. López-López *et al.*, 2013; Budakoglu *et al.*, 2014), este hecho podría indicar que la adaptación a ambientes hipersalinos puede extenderse a otros organismos del dominio *Archaea* más allá del orden *Halobacteriales* (Pagaling *et al.*, 2009).

Si bien el papel de las arqueas es muy importante en los ambientes hipersalinos, las bacterias pueden también desempeñar roles fundamentales en estas comunidades (Anton *et al.*, 1999; 2000). Este hecho se pone de manifiesto en la homogeneidad de los perfiles obtenidos en la DGGE para este dominio y la constancia de los grupos detectados (que se corresponden a su vez con los mayoritarios en otros ambientes hipersalinos: Cianobacteria, Bacteriodetes y Delta-proteobacteria). En este caso, es particularmente relevante la presencia en los nódulos de una única especie de cianobacteria, que se establece además como el único elemento común a todas las localizaciones muestreadas, lo que da muestra de su posible papel clave como productor primario en estas comunidades. Esta especie de cianobacteria presenta similitudes genéticas (92%) con organismos incluidos dentro del cluster de *Halothece*, un género que ha sido descrito en algunos ambientes hipersalinos (García-Pichel *et al.*, 1998a; Margheri *et al.*, 2008), aunque fenotípicamente, y tal vez como resultado de una convergencia adaptativa, presenta características morfológicas más similares al género *Chroococcidiopsis*, una cianobacteria común en los hábitats endolíticos e hipolíticos desérticos (e.g. Friedman, 1980; Azua-Bustos *et al.*, 2011) y cuya presencia ha sido descrita en otros ambientes endolíticos en Atacama incluido yesos e ignimbritas (DiRuggiero *et al.*, 2013; Wierzechos *et al.*, 2011; 2013; 2015; Cámara *et al.*, 2014). Es por ello que, la principal característica estructural convergente, su gruesa cubierta externa, puede constituir un elemento esencial en la ecología de esta cianobacteria ayudando a soportar los choques osmóticos por efecto de la concentración de sales o la desecación y contribuyendo a generar un microambiente de concentración de nutrientes y agua (Lange, 1976). En este sentido,

la cianobacteria presente en los nódulos podría constituir una nueva especie e incluso, dada la escasa similitud, un nuevo género, habiendo sido sugerido que además de criterios genéticos se combinen criterios ecológicos, que en ocasiones son determinantes en la asignación a especie o incluso a género para la resolución taxonómica (Kaštovský, & Johansen, 2008; De los Ríos *et al.*, 2010).

De igual manera, la presencia constante de un organismo relacionado con el género *Salinibacter* (OTU 19) en todas las localizaciones, salvo en la colonización de Salar Grande Sur superficial, presupone un papel destacado en estas comunidades (véase a continuación). Este organismo heterótrofo aerobio se ha descrito en ambientes de elevada concentración salina, donde en algunos casos llega a conformar una fracción significativa de la biomasa (Antón *et al.*, 1999; 2000), y presenta ciertas características propias de arqueas dado que junto con representantes del género *Halanaerobiales* son los únicos que presentan una estrategia *salt-in* dentro del dominio bacteria (Oren, 2013). La elevada microdiversidad observada en torno a este género (Peña *et al.*, 2005; 2010; Antón *et al.*, 2013) podría sugerir que es posible que los OTUs 20 y 21 se encuentren también relacionados con *Salinibacter*.

El resto de grupos bacterianos se encontraron exclusivamente en el área de Salar Grande Sur, lo que podría ser indicativo del efecto de las distintas condiciones microclimáticas en la diversidad de las comunidades microbianas presentes en las halitas. De estos, el OTU más relevante por su grado de similitud (96%) con una secuencia conocida de la base de datos del GenBank, se detectó en la colonización interna de Salar Grande Sur de la que se obtuvieron secuencia relacionadas con *Salinisphaera shabanensis*, un orden de gamma-proteobacteria capaz de crecer en un rango de concentraciones salinas entre el 1-28% y que presenta óptimos de crecimiento entre los 30-37 °C y pH 6,5-7,5. Este organismo vive en la interfase entre las salmueras de fondo del Mar Rojo y el agua de mar expuesto a drásticos gradientes concentración de sales por lo que utiliza la producción de solutos compatibles (ectoína y betaina) como estrategia de osmoadaptación. Las células de este organismo se corresponden con cocos pequeños de entre 0,7-1,2 µm que pueden presentarse solas o en parejas (Antunes *et al.*, 2003; 2011).

Posible dinámica trófica entre los microorganismos que componen los agregados.

En las comunidades hipersalinas donde se alcanza la saturación salina muchas de las vías metabólicas conocidas se encuentran inhibidas (Oren, 1999 y 2011c, Fig 19). Aunque la

caracterización metabólica de los microorganismos que componen los agregados no ha sido uno de los objetivos de esta tesis, la organización espacial de la comunidad y las interacciones observadas a través de los análisis por TEM entre los distintos componentes de los agregados, permitiría sugerir algunos aspectos de la dinámica trófica de estas comunidades. En este sentido, la cianobacteria y el alga, presente únicamente en las dos localizaciones de Salar Grande, constituirían los productores primarios del sistema y el resto de los grupos podrían considerarse, de forma general, como heterótrofos asociados que podrían contribuir al reciclaje de nutrientes (De los Rios *et al.*, 2010). El trabajo de Ziolkowsky y colaboradores (2013) analizando las formas isotópicas de carbono parece respaldar esta interpretación apuntando a que la mayor parte del carbono es de procedencia atmosférica y se obtiene vía autotrófica. A su vez este estudio muestra que el *turnover* del carbono es de unos 50 años en el caso de la localización de Salar Grande Sur y de unos 1000 ± 100 años en el caso de Yungay, lo cual sugiere que esta localización, la más extrema de todas las estudiadas, los niveles de actividad microbiana pueden ser muy reducidos (Ziolkowsky *et al.*, 2013).

Las interconexiones entre los grupos que forman parte de los agregados puede que tenga lugar, en primera instancia, mediante la liberación al medio de solutos orgánicos por parte de los organismos fotosintéticos al medio externo. Por ejemplo, en el caso de *Aphanothece halophytica*, que pertenece al cluster de *Halothece*, se ha observado como libera al medio glicina-betaína, que es el principal soluto compatible de las cianobacterias que viven en ambientes con elevada concentración de sal (en Oren, 2000 y referencias incluidas). Un estudio en tapetes microbianos hipersalinos ha descrito interacciones entre *Coleofasciculus (Microcoleus) chthonoplastes* y arqueas halófilas aerobias mediante la secreción de ácidos del ciclo del citrato (Zvyagintseva *et al.*, 2005). Por otro lado, en el caso de algas halófilas, como *Dunaliella* el principal soluto compatible es el glicerol (Oren, 2005). Algunos trabajos han mostrado como se forman cadenas tróficas donde el glicerol es metabolizado en primer lugar por *Salinibacter* que posteriormente secreta al medio dihidroxacetona que es aprovechada por arqueas pertenecientes a la familia de *Halobacteriales* (Elevi Bardavid & Oren, 2008; Elevi Bardavid *et al.*, 2008). Es por ello que la presencia constante de *Salinibacter* en los nódulos de Atacama puede que constituya una pieza clave en la dinámica de estas comunidades actuando como intermediario metabólico entre los productores primarios y los grupos de arqueas. En cuanto a los grupos de arqueas, la familia *Halobacteriales* se caracteriza por presentar demandas nutricionales y vías bioquímicas de metabolismo muy diversas (Falb *et al.*, 2008; Andrei *et al.*, 2012) y aunque de forma preferencial estos organismos utilizan aminoácidos como fuente de carbono y energía, se ha descrito el uso de

distintos carbohidratos, compuestos aromáticos e incluso ácidos grasos de cadena larga (Andrei *et al.*, 2012).

En este contexto, se ha observado a su vez la presencia de células de cianobacterias en clara senescencia celular (Roldan *et al.*, 2014) en el interior de las formas coloniales que mantienen su cubierta externa lo que pudiera ser indicativo de reciclaje de nutrientes dentro de la colonia (De los Ríos *et al.*, 2004). A su vez, cuando estas cubiertas se rompen se puede producir la entrada de heterótrofos oportunistas. Esta coexistencia de microorganismos vivos y muertos en los diferentes agregados puede ser interpretada como un elemento que garantiza la supervivencia de una parte del sistema incrementando la cantidad de nutrientes cuando las condiciones se vuelven desfavorables (Baati *et al.*, 2008; Billi., 2009; De los Rios *et al.*, 2010).

Cabe mencionar a su vez, que en el caso de los organismos halófilos se han descrito otras vías de obtención de energía mediante bombas de protones activadas por luz, bacteriorrodopsinas en el caso de haloarqueas, y xantorrodopsinas, en el caso de *Salinibacter*, que pueden llegar a producir ATP aunque no están consideradas una vía de fijación de carbono sino más bien un soporte para aquellos microorganismos que presentan fototaxis ayudando al movimiento de los flagelos en ecosistemas acuáticos (Oren, 2008; Lanyi & Balashov, 2008).

En el caso de la obtención de nitrógeno, se han descrito distintos géneros de cianobacterias en ambientes hipersalinos con cierta capacidad para la fijación de nitrógeno, incluidos los géneros *Chroococidiopsis* y *Halothece* (Friedmann & Kibler, 1980; Omoregie *et al.*, 2004), por lo que podría ser esperable la presencia de esta vía en la cianobacteria presente en los nódulos. Esta vía sería más importante en la localización de Yungay donde los registros de este estudio han mostrado la escasa influencia de las masas de aire oceánicas y por consiguiente de los aportes de nutrientes. Por otro lado, a pesar de que la desnitrificación ha sido registrada en cultivos próximos a la saturación salina y entendiendo que los procesos de génesis de nitratos por nitrificación no se producen a elevadas concentraciones salinas no es esperable que este proceso sea frecuente en hábitats naturales (Oren, 1994; 1999, 2011c).

Variaciones en la estructura de comunidad en las distintas localizaciones

Desde que Baas Biecking estableciera la hipótesis *everything is everywhere but the environment selects* (1934) la ecología microbiana ha intentado entender que factores controlan la

presencia, distribución y composición de las comunidades microbianas (Martiny *et al.*, 2006 y referencias en él). A pesar de que las comunidades microbianas litobióticas podrían estar consideradas entre los ecosistemas más simples conocidos (Walter and Pace, 2007a), actualmente no hay acuerdo sobre qué factores tienen más importancia a la hora de controlar la presencia y diversidad de microorganismos en estos ecosistemas. En los desiertos más extremos del planeta se ha sugerido que los procesos que regulan el establecimiento y desarrollo de las comunidades litobióticas, como la dispersión, colonización y extinción, se encuentran fuertemente influenciados por cambios regionales en las condiciones geofísicas y climáticas (en Wierzchos *et al.*, 2012 y De los Rios *et al.*, 2014). En este sentido, y recientemente, se ha mostrado que cuando las condiciones ambientales son similares, como en ciertas zonas del desierto de Atacama, son las características físico-mineralógicas de los sustratos líticos las que influyen en la estructura y diversidad en hábitats endolíticos (Wierzchos *et al.*, 2012; DiRuggiero *et al.*, 2013; Cámara *et al.*, 2014).

En el caso de los nódulos de halita en el desierto de Atacama, cuyas cualidades únicas no han sido observadas hasta el momento en ningún otro desierto, junto con la presencia de una posible comunidad propia de organismos altamente especializados no emparentada con otras comunidades microbianas en este desierto (Robinson *et al.*, 2015), sugiere que el reclutamiento de especies no responde en ningún modo a patrones al azar. En este sentido, un buen punto de partida para entender las peculiaridades de la colonización de los nódulos de halita, que conforman un tipo de hábitat uniforme en función de sus características físico-mineralógicas, sería entender su respuesta a los factores ambientales.

La DGGE ha resultado especialmente útil en el estudio comparado entre comunidades (e.g. Drees *et al.*, 2006) y su comportamiento frente a distintos tratamientos (e.g. Cullings *et al.*, 2005) así como de los cambios en las abundancias relativas de determinadas especies y la evolución de los ecosistemas microbianos a lo largo del tiempo (e.g. Van Elsas *et al.*, 2000). No obstante esta técnica ha mostrado limitaciones a la hora de representar el marco completo de la diversidad microbiana, sobre todo para aquellos organismos que presentan una baja abundancia y que por funcionalidad podrían constituir partes esenciales de los ecosistemas microbianos (Biosfera rara, Pedros-Alió, 2012). Motivo por el cual actualmente esta y otras técnicas de *fingerprinting* molecular están siendo progresivamente desplazadas a la hora de caracterizar las comunidades microbianas por metodologías denominadas *next generation sequencing*. En este contexto, la aparente debilidad de la técnica puede convertirse en fortaleza a la hora de analizar de forma

rápida y a bajo coste el efecto de los factores que condicionan la estructura de las comunidades microbianas en relación a los organismos dominantes entendiendo que son los grupos que presentan mayor abundancia aquellos que pueden reflejar de una forma más sencilla y directa los elementos que favorecen el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos (Casamayor *et al.*, 2000; Pedrós-Alió, 2012) permitiendo a su vez incorporar esta metodología como elemento *proxy* en los análisis de secuenciación masiva (Clearly *et al.*, 2012).

En el caso de las comunidades presentes en los nódulos de halita, y pesar de la uniformidad del tipo de hábitat, lejos de constituir poblaciones homogéneas los perfiles obtenidos de la DGGE muestran cambios en la estructura de comunidad entre y en cada una de las localizaciones estudiadas, siendo los grupos de arqueas los que recogen la mayor parte de esa variabilidad en cada área de muestreo.

A pesar de la menor representación en la riqueza de especies obtenidas con la DGGE en comparación con los datos registrados por Robinson y colaboradores (2015) mediante secuenciación masiva, se ha observado que los patrones de dominancia de bandas de DGGE obtenidos de los distintos nódulos pertenecientes a una misma localización presentan mayores similitudes entre sí que los patrones observados entre distintas áreas de muestreo. De esta forma, y tomando como representativas de cada localización las bandas cortadas y secuenciadas, se pueden establecer dos grandes conjuntos de muestras. Por un lado, se encuentran las localizaciones de Yungay, Lllamará y Salar Grande Norte, cuya microclimatología describe las características del desierto absoluto, que presentan un número similar de OTUs dominantes y en las que se mantiene estable la comunidad de bacterias, exhibiendo ligeras variaciones en la representación de OTUs de arqueas. Por otro lado, se encuentran los dos tipos de colonización del área de Salar Grande Sur, cuyas características indicarían que se trata de una zona de transición entre el desierto costero y el desierto absoluto, que presentan un mayor número de OTUs dominantes, muy emparentados entre sí (7 OTUs compartidos), y que muestran grandes diferencias en la estructura de comunidad tanto de arqueas como de bacterias con el resto de localizaciones.

La correspondencia entre los resultados del clúster de dos vías realizado para agrupar las distintas localidades en función de los distintos descriptores anuales de humedad relativa y temperatura (Fig. 31), con los resultados de la similitud entre localidades basado en el índice de Sorensen, en función de la composición de OTUs (Fig. 53C) sugiere que las diferencias en la estructura de cada comunidad entre los nódulos de distintas localidades podrían estar

correlacionadas con la variación en conjunto de ambos parámetros microclimáticos. Estos datos, se muestran en consonancia con otros estudios que han defendido que manteniendo al margen el tipo de sustrato lítico, son la abundancia de humedad y la temperatura, los factores que pueden regular la diversidad en hábitats líticos (Omelon *et al.*, 2006; Walter & Pace, 2007a; 2007b; Omelon, 2008 y referencias en él; Wierzchos *et al.*, 2012a).

En este sentido, estudios previos en los nódulos de halita han mostrado que de forma general es el valor anual de la humedad relativa media el factor que puede regular la estructura y diversidad de las comunidades presentes en los nódulos (De los Ríos *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2015). Los datos exhibidos en esta tesis muestran que aunque las poblaciones presentes en los nódulos responden al gradiente de humedad esta respuesta podría no encontrarse exclusivamente vinculada a los valores de humedad media diaria de cada localización, sino que tras observar la dinámica en el interior de los nódulos un descriptor más preciso sería la probabilidad de aparición de eventos en los que los nódulos se secan totalmente. En este sentido sería por tanto la intensidad y frecuencia de estos episodios a lo largo del año (perturbaciones) uno de los condicionantes que podría determinar el reclutamiento de organismos en estos ecosistemas (Chase, 2007), y el elemento principal que justificaría las diferencias en la composición de OTUs entre Salar Grande Sur, que no muestra la aparición de estos eventos, y Yungay, en la que estos eventos son frecuentes a lo largo del año. Bajo esta idea, y debido a la fuerte dependencia de la humedad respecto de las condiciones térmicas, las comunidades presentes en los nódulos podrían estar respondiendo a su vez a los valores máximos de temperatura diaria alcanzados en cada área de estudio y a la amplitud de la oscilación térmica diaria, que parece mostrarse, en función de la dinámica mensual, correlacionada negativamente con los valores mínimos diarios de HR.

Por otro lado, el trabajo de Pagaling y colaboradores (2009) en el que se registra la diversidad de seis lagos hipersalinos sugiere que, en el caso de las comunidades halófilas, las abundancias de los distintos microorganismos podrían exhibir una respuesta diferente frente a factores ambientales en función del dominio al que pertenecen. Este argumento podría explicar la relativa constancia en la presencia de OTUs de bacterias heterótrofas en las localizaciones de Yungay, Lllamará y Salar Grande Norte, que aparte de la humedad y la aparición de eventos secos, podrían estar respondiendo al valor máximo diario de la temperatura. En cambio la variabilidad en la presencia de los OTUs más abundantes de arqueas podría estar condicionada además, por la oscilación térmica diaria.

A su vez, la presencia del alga en Salar Grande, cuya presencia parece vinculada a la presencia de agua líquida constante en los nódulos de este área (Robinson *et al.*, 2015) no descartaría que la presencia de alguna de las especies de microorganismos heterótrofos pudiera encontrarse vinculada además al tipo de productor primario más abundante en cada localización de estudio y que a modo de cascada trófica pudiera establecer un conjunto diferente de relaciones entre los distintos organismos.

Una comunidad única capaz de vivir a elevadas concentraciones de sal.

Si bien se ha descrito que son las características higroscópicas y nanoporosas del sustrato las que permiten la obtención de agua líquida a partir de la humedad atmosférica (Wierzchos *et al.*, 2006, 2012b; Davila *et al.*, 2008), configurándose como la condición *sine qua non* que facilita la colonización de este hábitat, el interior de los nódulos de halita parece encontrarse en la zona más elevada de la escala de salinidad. Esta condición a la que han de enfrentarse las comunidades microbianas que residen en los nódulos de halita impone grandes desafíos a sus componentes en relación a la disponibilidad de agua libre y el mantenimiento de los sistemas intracelulares que hacen que la presencia de colonización y su vitalidad constituyan un signo que indicaría que estas comunidades son un sistema altamente especializado. En este sentido, además la presencia de cianobacterias en ambientes en los que la concentración de sales supera el 25% es infrecuente, haciendo de los nódulos de halita del desierto de Atacama un ambiente excepcional (Oren, 2015).

En este contexto, la riqueza de especies podría ser considerada como uno de los indicadores de la presión selectiva de este hábitat (Torsvik *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2001). En este estudio, esta presión podría estar confirmada por el bajo número de bandas obtenidas en las diferentes DGGEs realizadas que se muestra acorde con otros trabajos que, usando la misma técnica, muestran una reducción en la diversidad a medida que se incrementa la salinidad (Benlloch *et al.*, 2002, Casamayor *et al.*, 2002, Rothrock *et al.*, 2005). La riqueza de especies registrada es menor que la obtenida en un estudio reciente sobre estas mismas comunidades en estudios realizados mediante secuenciación masiva en los nódulos de halita (Robinson *et al.*, 2015), hecho que parece inherente a la mayor resolución de estas técnicas de secuenciación de nueva generación (Mardis, 2008; Roh *et al.* 2010). En el trabajo de Robinson y colaboradores (2015), se registraron en torno a los 86 OTUs en los nódulos del área de Yungay y

201 OTUs en el área de Salar Grande. No obstante, los datos registrados en esta tesis muestran concordancias con los grandes grupos descritos por Robinson y colaboradores (2015).

En este sentido, y con la cautela de que las secuencias obtenidas se consideran cortas para el establecimiento de afiliamientos taxonómicos concluyentes, la falta de coincidencia con secuencias de organismos taxonómicamente definidos en la base de datos del Genbank, podría indicar que las comunidades microbianas de los nódulos contienen especies nuevas, y diferentes a las presentes en los suelos circundantes u otros hábitats hipolíticos, casmoendolíticos y endolíticos del desierto de Atacama (Warren-Rhodes *et al.*, 2006; Azúa-Bustos *et al.*, 2011; Kuhlman *et al.*, 2008; Wierzchos *et al.*, 2011; 2013; 2015; DiRuggeiro *et al.*, 2013; Cámara *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2015), pero relacionadas a nivel de género y familia (similitudes entre el 81-97%) con algunos organismos presentes en otros ambientes hipersalinos y evaporíticos tanto en el núcleo hiperárido del desierto de Atacama (Lizama *et al.*, 2001; 2002; Demergasso *et al.*, 2004; Kharroub *et al.*, 2008, Gramain *et al.*, 2011; Stivaletta *et al.*, 2011) así como en otros hábitats hipersalinos terrestres (tapetes microbianos salinos, “playas”, minas de sal y salinas naturales y artificiales). Este hecho, y tomando en conjunto los resultados obtenidos en este estudio, parece indicar que las comunidades halladas en el interior de los nódulos son únicas y nativas de este sustrato.

Implicaciones astrobiológicas

La conjunción de un hábitat endolítico con un hábitat hipersalino en un escenario poliextremo como el desierto de Atacama, considerado como un análogo ambiental de Marte (Fairen *et al.*, 2010; Preston & Dartnell, 2014), junto con las descripciones de grandes extensiones de cloruros en la superficie de Marte (Osterloo *et al.*, 2008) y los recientes hallazgos de criosalmueras activas en su superficie (Ojha *et al.*, 2015), configuran a los nódulos de halita como un hábitat potencial para la búsqueda de indicios de vida en este planeta (Wierzchos *et al.*, 2006; Stivaletta & Barbieri, 2008; Davila *et al.*, 2010; Fairen *et al.*, 2010; Barbieri & Stivaletta, 2011; Gómez *et al.*, 2012; Wierzchos *et al.*, 2012a).

Por un lado, atendiendo a la principal analogía del desierto de Atacama con Marte, su extrema aridez, los resultados obtenidos en esta tesis han corroborado, que los nódulos superficiales de sal a través de sus propiedades higroscópicas (delicuescencia, Wierzchos *et al.*, 2006; Dávila *et al.*, 2008) y estructurales (microporosidad, Wierzchos *et al.*, 2012b), permiten extraer agua líquida de

la atmosfera incluso cuando los valores de humedad relativa no alcanzan el 75%. En este contexto, el trabajo de Dávila y colaboradores (2010) ha mostrado que la deliquesencia del NaCl permitiría la habitabilidad en términos de actividad de agua (a_w) en las condiciones ambientales actuales de la superficie de Marte en latitudes ecuatoriales. A su vez, y debido a las bajas temperaturas en la superficie de Marte, la bajada del punto de fusión del agua saturada en sal como consecuencia de la deliquesencia contribuiría a la estabilidad del agua líquida por debajo de los 0°C (Zorzano *et al.*, 2009).

Por otro lado, otro factor análogo de desierto de Atacama con Marte es la elevada radiación UV (Cockell *et al.*, 2000; Piacentini *et al.*, 2003; Cordero *et al.*, 2014; Wierzchos *et al.*, 2015) que junto con la desecación limitan la viabilidad de distintas formas de vida en la superficie del desierto (Dose *et al.*, 2001; Cockell *et al.*, 2008). En Marte, donde debido a la falta de capa de ozono la radiación UV es 1000 veces mayor que en Atacama (Cockell *et al.*, 2000; Cockell & Raven, 2004) la superficie se considera un ambiente estéril, trasladando las posibles zonas de habitabilidad donde se pueda realizar la fotosíntesis a ambientes que atenúen los niveles de radiación pero que al mismo tiempo permitan la transmisión de radiación fotosintéticamente activa (Cockell & Raven, 2004). En el caso de los hábitats endolíticos, los organismos fotosintéticos han de llegar a una solución de compromiso entre ambos factores que determina, en parte, su posicionamiento en el interior de la roca y la distancia a la superficie. Los datos ofrecidos en esta tesis sobre el ambiente lumínico en el interior de los nódulos ponen de manifiesto su capacidad para filtrar casi la totalidad de la radiación UV en los primeros milímetros de la roca, permitiendo a su vez la transmisión entre un 11-12% de la radiación fotosintéticamente activa incidente entre los 6-9 mm de la superficie. Esta gran capacidad de transmisión de luz PAR, junto con la observación de la presencia de colonización en regiones más profundas de los nódulos, se considera de gran relevancia para el establecimiento zonas de habitabilidad donde se pueda realizar la fotosíntesis, dado que como consecuencia de la distancia entre el Sol y Marte los niveles de PAR en superficie son un 55% menores que los registrados en la Tierra (Cockell & Raven, 2004). En este sentido, el papel de la morfología de los nódulos a modo de colector de luz parece ser determinante en el incremento de PAR registrado sobre estudios previos que limitaban la zona de habitabilidad a unos 3 mm de la superficie (Cockell & Raven, 2004). A su vez, cabe mencionar que como se ha observado en los análisis de la calidad de luz que penetra a distintas profundidades de los nódulo, el porcentaje de radiación en la región del espectro correspondiente al infrarrojo es elevada, lo que podría sugerir que el calor por radiación podría transmitirse eficazmente hacia el interior de la roca y las zonas colonizadas.

Conclusiones

1-La virtual ausencia de precipitaciones atmosféricas y la escasa humedad ambiental junto con los valores extremadamente elevados de radiación incidente constituyen los principales factores que limitan el establecimiento de comunidades microbianas funcionales en el núcleo hiperárido del desierto de Atacama. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los nódulos de halita: delicuescencia, microporosidad, morfología y capacidad para filtrar la radiación UV permitiendo el paso de radiación fotosintéticamente activa, establece a estos como el único sustrato lítico en el núcleo hiperárido de este desierto que es capaz de albergar comunidades microbianas endolíticas basadas en fotosíntesis. Los datos obtenidos en esta tesis sugieren la existencia de una estrecha dependencia funcional entre el sustrato de roca y los organismos que la colonizan y configuran a los nódulos superficiales de halita como un hábitat potencial para la búsqueda de indicios de vida en Marte.

2-Aunque todas las áreas estudiadas se encuentran dentro de la delimitación geográfica del núcleo hiperárido del desierto de Atacama, que se caracteriza por su elevada estabilidad climática, el registro de datos microclimáticos en el entorno de los nódulos de halita ha mostrado diferencias relevantes en relación a los valores de humedad relativa y temperatura en cada localización. Estos registros muestran que Yungay constituye la localización más extrema, en relación a los bajos niveles de humedad relativa, la elevada temperatura y oscilación térmica, y que no se encuentra sometida como el resto de áreas de estudio a masas de aire húmedas procedentes del océano, incluida la *Camanchaca*. En el otro extremo se sitúa la localidad de Salar Grande Sur que en función de sus elevados niveles de humedad relativa, el valor moderado de su temperatura y reducida oscilación térmica sugieren que podría tratarse de una zona de transición entre el desierto costero y el desierto absoluto.

3-La variabilidad microclimática en el exterior de los nódulos induce claramente diferentes comportamientos microclimáticos en el interior de los nódulos de halita. Se ha observado que en el interior de los nódulos de Salar Grande Sur la presencia de agua líquida ha sido constante durante todo el periodo de medidas (6 meses), mientras que en Yungay sólo se observó la presencia de agua líquida el 66% del tiempo registrado.

4-Las diferencias en la humedad relativa y la temperatura en el entorno de los nódulos de halita condicionan su estructura porosa. Se ha observado que la porosidad en el interior de los nódulos responde al valor medio de humedad relativa en cada localización y que la porosidad de la capa externa del nódulo así su tamaño estaría además condicionada por los valores de temperatura máxima diaria y oscilación térmica.

5- Los nódulos han mostrado una elevada capacidad para filtrar la radiación UV a través de los primeros mm de la roca, permitiendo a su vez la transmisión de radiación PAR sobre todo en regiones del espectro de mayor longitud de onda que coinciden con los picos de absorción máxima del fotosistema II de la clorofila. A su vez, la morfología de los nódulos podría estar actuando como un colector de luz, lo que explicaría la elevada capacidad de transmisión de radiación PAR hacia el interior del nódulo cuando este está húmedo. La presencia de grandes cantidades de escitonemina sugiere que algunas de las comunidades microbianas presentes en los nódulos podrían estar adaptadas a ambientes de elevada radiación, tal vez como respuesta al tiempo de exposición a la radiación que alcanza la zona de colonización o por el carácter dinámico de los nódulos que al disolverse pueden dejar expuesta a la comunidad.

6- En los nódulos se dan las condiciones necesarias para realizar la fotosíntesis, pero dado que la colonización está compuesta por un reducido número de filotipos y los bajos valores de biomasa, las condiciones hipersalinas en el interior de los nódulos de halita podrían estar imponiendo condicionantes limitantes añadidos a la colonización microbiana, incrementando la presión selectiva del hábitat.

7- En la colonización que se produce en los nódulos de halita la unidad funcional básica está compuesta por agregados celulares compuestos por un posible nuevo género de cianobacteria, como productor primario, y agrupaciones de bacterias no fotosintéticas y arqueas, todos ellos embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) dentro de la cual se producen distintas interacciones bióticas y abióticas. A esta organización básica se suma la presencia de otro productor primario (alga) en las dos localidades de Salar Grande.

8- La producción de EPS por los microorganismos colonizadores de los nódulos de halita podría facilitar la adsorción y retención de agua, tanto de fase líquida como en forma de vapor. Pero además podría facilitar la supervivencia y actividad de los distintos microorganismos de los agregados al minimizar la superficie de contacto de las células de la cianobacteria con el medio salino y facilitar las interrelaciones con los microorganismos heterótrofos.

9- A microescala, los agregados celulares se disponen en el interior de los nódulos de halita ocupando espacios entre los cristales de halita, donde se ha observado la presencia de agua líquida en forma de salmuera. A su vez, los espacios con aire que podrían facilitar el intercambio gaseoso. En cambio los patrones de colonización observados a macroescala, en forma de bandas

y en volumen, podrían estar obedeciendo al posicionamiento de los agregados en zonas de acumulación de agua y a la dirección de la radiación incidente y/o reflejada del suelo.

10- Las diferencias en la estructura de comunidad microbiana entre los nódulos de distintas áreas del desierto de Atacama parece responder a la variación en conjunto de los parámetros microclimáticos. Los factores observados que presentan mayor influencia son el valor de la humedad relativa media, la probabilidad de aparición de eventos en los que los nódulos se secan totalmente, el valor máximo de la temperatura diaria y el valor de la oscilación térmica.

11- La combinación de un hábitat endolítico e hipersalino en un ambiente poliextremo como el desierto de Atacama hace de los nódulos de halita un microecosistema excepcional y altamente especializado cuyas comunidades microbianas podrían ser consideradas como únicas y nativas de este singular sustrato lítico.

Referencias

- Aanderud, Z. T., Shuldman, M. I., Drenovsky, R. E., & Richards, J. H. (2008). Shrub-interspace dynamics alter relationships between microbial community composition and belowground ecosystem characteristics. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2206-2216.
- Agam, N., & Berliner, P. R. (2006). Dew formation and water vapor adsorption in semi-arid environments—a review. *Journal of Arid Environments*, 65(4), 572-590.
- Allen, E. E., & Banfield, J. F. (2005). Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 489-498.
- Alpert, P. (2005). The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 685-695.
- Amann RI., Ludwig W., Schleifer KH. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143–169
- Andrei, A. Ș., Banciu, H. L., & Oren, A. (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS microbiology letters*, 330(1), 1-9.
- Andrew, D. R., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., Racolta, A., Martinson, V. G., & Dontsova, K. (2012). Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran Desert soils. *Applied and environmental microbiology*, 78(21), 7527-7537.
- Antón J., Llobet-Brossa F. Rodríguez-Valera, R. Amann. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*. 1:517–523.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., & Amann, R. (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and environmental microbiology*, 66(7), 3052-3057.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., & Rosselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 485-491.
- Antón, J., Peña, A., Valens, M., Santos, F., Glöckner, F. O., Bauer, M., ... & Amann, R. (2005). *Salinibacter ruber*: genomics and biogeography. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (pp. 255-266). Springer Netherlands.

- Antón, J., Peña, A., Santos, F., Martínez-García, M., Schmitt-Kopplin, P., & Rosselló-Mora, R. (2008). Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems*, 4(1), 15.
- Antón, J., Lucio, M., Peña, A., Cifuentes, A., Brito-Echeverría, J., Moritz, F., ... & Rosselló-Móra, R. (2013). High metabolomic microdiversity within co-occurring Isolates of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *PloS one*, 8(5), e64701.
- Antunes, A., Eder, W., Fareleira, P., Santos, H., & Huber, R. (2003). *Salinisphaera shabanensis* gen. nov., sp. nov., a novel, moderately halophilic bacterium from the brine-seawater interface of the Shaban Deep, Red Sea. *Extremophiles*, 7(1), 29-34.
- Antunes, A., Alam, I., Bajic, V. B., & Stingl, U. (2011). Genome sequence of *Salinisphaera shabanensis*, a gammaproteobacterium from the harsh, variable environment of the brine-seawater interface of the Shaban Deep in the Red Sea. *Journal of bacteriology*, 193(17), 4555-4556.
- Arenz, B. E., Held, B. W., Jurgens, J. A., Farrell, R. L., & Blanchette, R. A. (2006). Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10), 3057-3064.
- Artieda, O., Davila, A., Wierzchos, J., Buhler, P., Rodríguez- Ochoa, R., Pueyo, J., & Ascaso, C. (2015). Surface evolution of salt- encrusted playas under extreme and continued dryness. *Earth Surface Processes and Landforms*.
- Ascaso C, Wierzchos J & De Los Rios A (1995) Cytological investigations of lithobiontic microorganisms in granitic rocks. *Botanica Acta* 108, 474-481.
- Ascaso C, Wierzchos J & Castello R (1998) Study of the biogenic weathering of calcareous litharenite stones caused by lichen and endolithic microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation* 42, 29-38.
- Ascaso C & Wierzchos J (2002). New approaches to the study of Antarctic lithobiontic microorganisms and their inorganic traces, and their application in the detection of life in Martian rocks. *International Microbiology* 5:215-222.
- Ascaso, C., & Wierzchos, J. (2003). The search for biomarkers and microbial fossils in Antarctic rock microhabitats. *Geomicrobiology Journal*, 20(5), 439-450.

- Asgarani, E., Funamizu, H., Saito, T., Terato, H., Ohyama, Y., Yamamoto, O., & Ide, H. (1999). Mechanisms of DNA protection in *Halobacterium salinarum*, an extremely halophilic bacterium. *Microbiological research*, 154(2), 185-190.
- Asker, D., & Ohta, Y. (2002). *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 729-738.
- Atlas, R. M. (1984). Diversity of microbial communities. In *Advances in microbial ecology* (pp. 1-47). Springer US.
- Auguet, J. C., Barberan, A., & Casamayor, E. O. (2010). Global ecological patterns in uncultured Archaea. *The ISME journal*, 4(2), 182-190.
- Azúa-Bustos, A., González-Silva, C., Mancilla, R. A., Salas, L., Gómez-Silva, B., McKay, C. P., & Vicuña, R. (2011). Hypolithic cyanobacteria supported mainly by fog in the coastal range of the Atacama Desert. *Microbial ecology*, 61(3), 568-581.
- Azua-Bustos, A., González-Silva, C., Arenas-Fajardo, C., & Vicuña, R. (2012). Extreme environments as potential drivers of convergent evolution by exaptation: the Atacama Desert Coastal Range case. *Frontiers in microbiology*, 3.
- Baas Becking LGM (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde Diligentia Wetensch. Serie 18/19*, van Stockum's Gravenhange, 263 pp
- Baati, H., Guerhazi, S., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A., & Ammar, E. (2008). Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles*, 12(4), 505-518.
- Bahl, J., Lau, M. C., Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Cary, S. C., Lacap, D. C., ... & Pointing, S. B. (2011). Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria. *Nature communications*, 2, 163.
- Ball, P. (2004). Astrobiology: Water, water, everywhere?. *Nature*, 427(6969), 19-20.
- Barbieri, R., & Stivaletta, N. (2011). Continental evaporites and the search for evidence of life on Mars. *Geological Journal*, 46(6), 513-524.
- Belnap, J. (2003). The world at your feet: desert biological soil crusts. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(4), 181-189.

- Belnap, J. (2006). The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrological processes*, 20(15), 3159-3178.
- Benavente, D., del Cura, M. G., & Ordóñez, S. (2003). Salt influence on evaporation from porous building rocks. *Construction and Building Materials*, 17(2), 113-122.
- Benlloch, S., Acinas, S. G., Martínez-Murcia, A. J., & Rodríguez-Valera, F. (1996). Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. In *Coastal Lagoon Eutrophication and Anaerobic Processes (CLE AN.)* (pp. 19-31). Springer Netherlands.
- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F. ... & Rodríguez-Valera, F. (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 349-360.
- Beraldi-Campesi, H. (2013). Early life on land and the first terrestrial ecosystems. *Ecological Processes*, 2(1), 1-17.
- Berner, T., & Evenari, M. (1978). The influence of temperature and light penetration on the abundance of the hypolithic algae in the Negev Desert of Israel. *Oecologia*, 33(2), 255-260.
- Bhatnagar A & Bhatnagar M (2005). Microbial diversity in desert ecosystems. *Current Science* 89:91-100.
- Bibring, J. P., Langevin, Y., Mustard, J. F., Poulet, F., Arvidson, R., Gendrin, A., ... & Neukum, G. (2006). Global mineralogical and aqueous Mars history derived from OMEGA/Mars Express data. *Science*, 312(5772), 400-404.
- Billi, D. (2009). Subcellular integrities in *Chroococcidiopsis* sp. CCMEE 029 survivors after prolonged desiccation revealed by molecular probes and genome stability assays. *Extremophiles*, 13(1), 49-57.
- Blank, C. E. (2009). Not so old Archaea—the antiquity of biogeochemical processes in the archaeal domain of life. *Geobiology*, 7(5), 495-514.
- Blank, C. E. (2009b). Phylogenomic dating-the relative antiquity of Archaeal Metabolic and Physiological Traits. *Astrobiology*, 9(2), 193-219.
- Boucher, Y., Douady, C. J., Sharma, A. K., Kamekura, M. & Doolittle, W. F. (2004). Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among haloarchaeal rRNA genes. *J Bacteriol* 186, 3980–3990

- Bowers, K. J., Mesbah, N. M., & Wiegel, J. (2009). Biodiversity of poly-extremophilic bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life. *Saline Systems*, 5(9).
- Bowker, M. A., Soliveres, S., & Maestre, F. T. (2010). Competition increases with abiotic stress and regulates the diversity of biological soil crusts. *Journal of Ecology*, 98(3), 551-560.
- Brack, A., Horneck, G., & Wynn-Williams, D. (2001). Exo/astrobiology in Europe. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31(4-5), 459-480.
- Brock, T.D. (1967) Micro-organisms adapted to high temperatures. *Nature*, v214, p882-885
- Brock, T.D. (1979) Ecology of saline lakes. In *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*, ed Shilo, M. pp. 29–47, Weinheim: Verlag-Chemie.
- Brown D, Ascaso C & Rapsh S (1987). Ultrastructural changes in the pyrenoid of the lichen *Parmelia sulcata* stored under controlled conditions. *Protoplasma* 136:136- 144.
- Budakoglu, M., Kurt, H., Karaman, M., Kumru, M., Kumral, M., & Akarsubaşı, A. T. (2014). Archaeal Microbial Diversity of Hypersaline Lake Acıgöl, Denizli, Turkey. *Geomicrobiology Journal*, 31(6), 454-460.
- Büdel, B., Bendix, J., Bicker, F. R., & Green, T. G. (2008). Dewfall as a water source frequently activates the endolithic cyanobacterial communities in the granites of Taylor Valley, Antarctica. *Journal of Phycology*.
- Bungartz, F., & Wirth, V. (2007). *Buellia peregrina* sp. nov., a new, euendolithic calcicolous lichen species from the Namib Desert. *The Lichenologist*, 39(01), 41-45.
- Cáceres, L., Gómez-Silva, B., Garró, X., Rodríguez, V., Monardes, V., & McKay, C. P. (2007). Relative humidity patterns and fog water precipitation in the Atacama Desert and biological implications. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012), 112(G4).
- Cámara, B., De los Ríos, A., García del Cura, M. A., Galván, V., & Ascaso, C. (2008). Dolostone bioreceptivity to fungal colonization. *Materiales de Construcción*, 58(289-290), 113-124.
- Cámara, B., Suzuki, S., Nealson, K. H., & Ascaso, C. (2014). Ignimbrite textural properties as determinants of endolithic colonization patterns from hyper-arid Atacama Desert.
- Capes M.D., P. DasSarma, and S. DasSarma. 2012. The core and unique proteins of haloarchaea. *BMC Genomics* 13:39.

- Carr, M. H. (1996). *Water on Mars*. New York: Oxford University Press, c1996, 1.
- Carroll, D. (1959). Ion exchange in clays and other minerals. *Geological Society of America Bulletin*, 70(6), 749-779.
- Cary, S. C., McDonald, I. R., Barrett, J. E., & Cowan, D. A. (2010). On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nature Reviews Microbiology*, 8(2), 129-138.
- Casamayor, E. O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C., & Muyzer, G. (2000). Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 499-508.
- Casamayor, E. O., Muyzer, G., & Pedrós-Alió, C. (2001). Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquatic Microbial Ecology*, 25(3), 237-246.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V. J., ... & Pedrós - Alió, C. (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 338-348.
- Castenholz, R. W., & Garcia-Pichel, F. (2002). Cyanobacterial responses to UV-radiation. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 591-611). Springer Netherlands.
- Catchpole, R. J., & Poole, A. M. (2014). Antibiotic genes spread far and wide. *eLife*, 3.
- Cavicchioli, R. (2002). Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, 2(3), 281-292.
- Cereceda P., Osses P., Larraín H., Farías M., Lagos M., Pinto R. & Schemenauer R. S. (2002), Advective, orographic and radiation fog in the Tarapaca region, Chile, *Atmospheric Research*, vol. 64, pp. 261-271.
- Cereceda, P., Larrain, H., Osses, P., Farías, M., & Egaña, I. (2008). The climate of the coast and fog zone in the Tarapacá Region, Atacama Desert, Chile. *Atmospheric Research*, 87(3), 301-311.
- Cereceda, P., Errázuriz, A. M., & Osses, P. (2009). Atacama. Ocupación actual del desierto y del semidesierto de Chile. *Estudios Geográficos*, 70(266), 41-77.

- Chan, Y., Lacap, D. C., Lau, M. C., Ha, K. Y., Warren - Rhodes, K. A., Cockell, C. S., ... & Pointing, S. B. (2012). Hypolithic microbial communities: between a rock and a hard place. *Environmental microbiology*, 14(9), 2272-2282.
- Chase, J. M. (2007). Drought mediates the importance of stochastic community assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(44), 17430-17434.
- Chin, J. P., Megaw, J., Magill, C. L., Nowotarski, K., Williams, J. P., Bhaganna, P., ... & Hallsworth, J. E. (2010). Solutes determine the temperature windows for microbial survival and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 7835-7840.
- Chivian, D., Brodie, E. L., Alm, E. J., Culley, D. E., Dehal, P. S., DeSantis, T. Z., ... & Onstott, T. C. (2008). Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Science*, 322(5899), 275-278.
- Chong-Díaz, G. (1988). The Cenozoic saline deposits of the Chilean Andes between 18 00' and 27 00' south latitude. In *The Southern Central Andes* (pp. 137-151). Springer Berlin Heidelberg.
- Chong Díaz, G., Mendoza, M., García-Veigas, J., Pueyo, J. J., & Turner, P. (1999). Evolution and geochemical signatures in a Neogene forearc evaporitic basin: the Salar Grande (Central Andes of Chile). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 151(1), 39-54.
- Clarke, J. D. (2006). Antiquity of aridity in the Chilean Atacama Desert. *Geomorphology*, 73(1), 101-114.
- Cleary, D. F., Smalla, K., Mendonça-Hagler, L. C., & Gomes, N. C. (2012). Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *PloS one*, 7(1), e29380.
- Cockell, C. S., & Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 74(03), 311-345.
- Cockell, C. S., Catling, D. C., Davis, W. L., Snook, K., Kepner, R. L., Lee, P., & McKay, C. P. (2000). The ultraviolet environment of Mars: biological implications past, present, and future. *Icarus*, 146(2), 343-359.
- Cockell, C. S., & Raven, J. A. (2004). Zones of photosynthetic potential on Mars and the early Earth. *Icarus*, 169(2), 300-310.
- Cockell, C. S., McKay, C. P., Warren-Rhodes, K., & Horneck, G. (2008). Ultraviolet radiation-induced limitation to epilithic microbial growth in arid deserts—Dosimetric experiments in the hyperarid core of the Atacama Desert. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 90(2), 79-87.

- Collins, H. P., & Cavigelli, M. A. (2003). Soil microbial community characteristics along an elevation gradient in the Laguna Mountains of Southern California. *Soil biology and biochemistry*, 35(8), 1027-1037.
- Connon, S. A., Lester, E. D., Shafaat, H. S., Obenhuber, D. C., & Ponce, A. (2007). Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012), 112(G4).
- Cordero, R. R., Seckmeyer, G., Damiani, A., Riechelmann, S., Rayas, J., Labbe, F., & Laroze, D. (2014). The world's highest levels of surface UV. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(1), 70-81.
- Cowan, D. A., Russell, N. J., Mamais, A., & Sheppard, D. M. (2002). Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass. *Extremophiles*, 6(5), 431-436.
- Cowan, D. A., & Casanueva, A. (2007). Stability of ATP in Antarctic mineral soils. *Polar Biology*, 30(12), 1599-1603.
- Cowan, D. A., Khan, N., Pointing, S. B., & Cary, S. C. (2010). Diverse hypolithic refuge communities in the McMurdo Dry Valleys. *Antarctic Science*, 22(06), 714-720.
- Crits-Christoph, A., Robinson, C. K., Barnum, T., Fricke, W. F., Davila, A. F., Jedynak, B., McKay CP & DiRuggiero, J. (2013). Colonization patterns of soil microbial communities in the Atacama Desert. *Microbiome*, 1(1), 28.
- Cullings, K., Raleigh, C., New, M. H., & Henson, J. (2005). Effects of artificial defoliation of pines on the structure and physiology of the soil fungal community of a mixed pine-spruce forest. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1996-2000.
- Curtis, T. P., & Sloan, W. T. (2004). Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current opinion in microbiology*, 7(3), 221-226.
- Darwin, C. R., 1876, *Geological observations on the volcanic islands and parts of South America visited during the voyage of H.M.S. 'Beagle'*: 2d. ed., London 647 p.; reprinted 1915 by D. Appleton and Co., New York
- DasSarma, S. (2006). Extreme halophiles are models for astrobiology. *MICROBE-AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY*, 1(3), 120.
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847-867.

- Davila, A. F., Gómez-Silva, B., de Los Rios, A., Ascaso, C., Olivares, H., McKay, C. P., & Wierzchos, J. (2008). Facilitation of endolithic microbial survival in the hyperarid core of the Atacama Desert by mineral deliquescence. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012), 113(G1).
- Davila, A. F., Duport, L. G., Melchiorri, R., Jänchen, J., Valea, S., de Los Rios, A., Fairén, A.G. Möhlmann, D., McKay, C.P., Ascaso, C. & Wierzchos, J. (2010). Hygroscopic salts and the potential for life on Mars. *Astrobiology*, 10(6), 617-628.
- Davila, A. F., Hawes, I., Ascaso, C., & Wierzchos, J. (2013). Salt deliquescence drives photosynthesis in the hyperarid Atacama Desert. *Environmental microbiology reports*, 5(4), 583-587.
- Davila, A. F., Hawes, I., García Araya, J., Gelsinger, D. R., DiRuggiero, J., Ascaso, C., ... & Wierzchos, J. (2015). In situ metabolism in halite endolithic microbial communities of the hyperarid Atacama Desert. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1035.
- De la Haba, R., Sánchez-Porro, C., Márquez, M., & Ventosa, A. (2011). Taxonomy of halophiles. In *Extremophiles handbook*.
- De La Torre, R., Sancho, L. G., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzchos, J., Olsson-Francis, K., ... & Demets, R. (2010). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus*, 208(2), 735-748.
- De los Ríos A., Ascaso C., Wierzchos J. (1999). Study of lichens with different state of hydration by the combination of Low Temperature Scanning Electron and Confocal Laser Scanning microscopies. *International Microbiology* 2, pp 251-257.
- De los Ríos A & Ascaso C (2002). Preparative techniques for transmission electron microscopy and confocal laser scanning microscopy of lichens. Pages 87-151 en Kranner I, Beckett R P & Varma A K, editores. *Protocols in Lichenology*. Springer, Berlin.
- De Los Ríos, A., Wierzchos, J., G Sancho, L., Grube, M., & Ascaso, C. (2002). Microbial endolithic biofilms: a means of surviving the harsh conditions of the Antarctic.
- De los Ríos A., Wierzchos J., Sancho LG., Ascaso C. (2003). Acid microenvironments in microbial biofilms of Antarctic endolithic microecosystems. *Environmental Microbiology* 5(4), 231-237
- De los Ríos A., Wierzchos J, Sancho L.G., Ascaso C. (2004). Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 50, 143-152.

- De los Ríos, A., Wierzechos, J., Sancho, L. G., Green, T. G., & Ascaso, C. (2005a). Ecology of endolithic lichens colonizing granite in continental Antarctica.
- De los Ríos, A., Sancho, L. G., Grube, M., Wierzechos, J., & Ascaso, C. (2005b). Endolithic growth of two *Lecidea* lichens in granite from continental Antarctica detected by molecular and microscopy techniques. *New Phytologist*, 165(1), 181-190.
- De Los Ríos, A., Grube, M., Sancho, L. G., & Ascaso, C. (2007). Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing Antarctic granite rocks. *FEMS microbiology ecology*, 59(2), 386-395.
- De los Ríos, A., Valea, S., Ascaso, C., Davila, A., Kastovsky, J., McKay, C. P., Gomez-Silva B & Wierzechos, J. (2010a). Comparative analysis of the microbial communities inhabiting halite evaporites of the Atacama Desert. *International Microbiology*, 13(2), 78-89.
- De Los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzechos, J., & Sancho, L. G. (2010b). Space flight effects on lichen ultrastructure and physiology. In *Symbioses and Stress* (pp. 577-593). Springer Netherlands.
- De Los Ríos, A., Wierzechos, J., & Ascaso, C. (2014a). The lithic microbial ecosystems of Antarctica's McMurdo Dry Valleys. *Antarctic Science*, 26(05), 459-477.
- De los Ríos, A., Cary, C., & Cowan, D. (2014b). The spatial structures of hypolithic communities in the Dry Valleys of East Antarctica. *Polar Biology*, 37(12), 1823-1833.
- De Vera, J. P. (2012). Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecology*, 5(4), 472-479.
- DeLuca, M., Wannlund, J., & McElroy, W. D. (1979). Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luciferase. *Analytical biochemistry*, 95(1), 194-198.
- Demergasso, C., Casamayor, E. O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., & Pedrós-Alió, C. (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS microbiology ecology*, 48(1), 57-69.
- Dennis, P. P., & Shimmin, L. C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 90-104.
- Desbois, G., Urai, J. L., Burkhardt, C., Drury, M. R., Hayles, M., & Humbel, B. (2008). Cryogenic vitrification and 3D serial sectioning using high resolution cryo - FIB SEM technology for brine - filled grain boundaries in halite: first results. *Geofluids*, 8(1), 60-72.
- Diels L. (1914). Die Algen-Vegetation der Südtiroler Dolomitriffe. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 32:502–26

- Dillon, J. G., & Castenholz, R. W. (1999). Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment, protects against UVC radiation: implications for early photosynthetic life. *Journal of Phycology*, 35(4), 673-681.
- DiRuggiero, J., Wierzchos, J., Robinson, C. K., Souterre, T., Ravel, J., Artieda, O., ... & Ascaso, C. (2013). Microbial colonisation of chasmoendolithic habitats in the hyper-arid zone of the Atacama Desert. *Biogeosciences*, 10, 2439-2450.
- Dong H, Rech J A, Jiang H, Sun H & Buck B J (2007). Endolithic cyanobacteria in soil gypsum: occurrences in Atacama (Chile), Mojave (United states), and Al-Jafr Basin (Jordan) deserts. *Journal of Geophysical Research* 112.
- Dong, H., & Yu, B. (2007). Geomicrobiological processes in extreme environments: A review. *Episodes*, 30(3), 202.
- Dorn, R. I., & Oberlander, T. M. (1981). Microbial origin of desert varnish. *Science*, 213(4513), 1245-1247.
- Dose, K., A. Bieger-Dose, B. Ernst, U. Feister, B. Gomez-Silva, A. Klein, S. Risi, and C. Stridde. (2001). Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert. *Orig. Life Evol. Biosph.* 31:287-303.
- Drees, K. P., Neilson, J. W., Betancourt, J. L., Quade, J., Henderson, D. A., Pryor, B. M., & Maier, R. M. (2006). Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7902-7908.
- Duarte, G. F., Rosado, A. S., Seldin, L., de Araujo, W., & van Elsas, J. D. (2001). Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Applied and environmental microbiology*, 67(3), 1052-1062.
- Ehling-Schulz, M., Bilger, W., & Scherer, S. (1997). UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology*, 179(6), 1940-1945.
- Ehling-Schulz, M., & Scherer, S. (1999). UV protection in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 34(4), 329-338.
- Elevi Bardavid R & Oren A (2008) Dihydroxyacetone metabolism in *Salinibacter ruber* and in *Haloquadratum walsbyi*. *Extremophiles* 12: 125–131.

- Elevi Bardavid R, Khristo P & Oren A (2008) Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* 12: 5–14.
- Empadinhas, N., & da Costa, M. (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, 11(3), 151-161.
- Ericksen, G. E. (1983). The Chilean Nitrate Deposits: The origin of the Chilean nitrate deposits, which contain a unique group of saline minerals, has provoked lively discussion for more than 100 years. *American Scientist*, 366-374.
- Ericksen, G. E. (1993). Upper Tertiary and Quaternary continental saline deposits in the central Andean region. *Mineral Deposit Modeling*. Geological Association of Canada Special Paper, 40, 89-102.
- Estrada, M., Henriksen, P., Gasol, J. M., Casamayor, E. O., & Pedrós-Alió, C. (2004). Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(2), 281-293.
- Ewing HA, Weathers KC, Templer PH, Dawson TE, Firestone MK, Elliott AM, Boukili VKS (2009) Fog water and ecosystem function: heterogeneity in a California redwood forest. *Ecosystems* 12:417–433
- Fairén, A. G., Fernández-Remolar, D., Dohm, J. M., Baker, V. R., & Amils, R. (2004). Inhibition of carbonate synthesis in acidic oceans on early Mars. *Nature*, 431(7007), 423-426.
- Fairén, A. G., Davila, A. F., Gago-Duport, L., Amils, R., & McKay, C. P. (2009). Stability against freezing of aqueous solutions on early Mars. *Nature*, 459(7245), 401-404.
- Fairén A G, Davila A F, Lim D, Bramall N, Bonaccorsi R, Zavaleta J, Uceda E R, StokerC, Wierzchos J, Dohm J M, Amils R, Andersen D & McKay C P (2010). Astrobiology through the ages of Mars: the study of terrestrial analogues to understand the habitability of Mars. *Astrobiology* 10:821-843.
- Falb M, Muller K, Konigsmair L, Oberwinkler T, Horn P, von Gronau S, Gonzalez O, Pfeiffer F, Bornberg-Bauer E, Oesterhelt D (2008) Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* 12: 177–196
- Falcioni T, Papa S, Gasol JM (2008) Evaluating the flow-cytometric nucleic acid double-staining protocol in realistic situations of planktonic bacterial death. *Applied Environmental Microbiology* 74:1767–1779

- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039.
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 538-550.
- Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhueimer, M., Gruber, C., Weidler, G., Gerbl, F., & Stan-Lotter, H. (2007). Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. In *Life in Extreme Environments* (pp. 125-140). Springer Netherlands.
- Fernández-Remolar, D. C., Chong- Díaz, G., Ruíz-Bermejo, M., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P., Tziotis, D., ... & Parro, V. (2013). Molecular preservation in halite and perchlorate-rich hypersaline subsurface deposits in the Salar Grande basin (Atacama Desert, Chile): Implications for the search for molecular biomarkers on Mars. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 118(2), 922-939.
- Foster, M. C., & Ewing, G. E. (2000). Adsorption of water on the NaCl (001) surface. II. An infrared study at ambient temperatures. *The Journal of Chemical Physics*, 112(15), 6817-6826.
- Franzen, C., and P. W. Mirwald. 2009. Moisture sorption behaviour of salt mixtures in porous stone. *Chemie der Erde—Geochemistry* 69 (1): 91–98.
- Friedmann, I., Lipkin, Y., & Ocampo-Paus, R. (1967). Desert algae of the Negev (Israel). *Phycologia*, 6(4), 185-200.
- Friedmann EI, Ocampo R. 1976. Endolithic blue-green-algae in dry valleys—primary producers in Antarctic desert ecosystem. *Science* 193:1247–49
- Friedmann E I (1980). Endolithic microbial life in hot and cold desserts. *Origins of life* 10:223-235.
- Friedmann, E. I., & Kibler, A. P. (1980). Nitrogen economy of endolithic microbial communities in hot and cold deserts. *Microbial ecology*, 6(2), 95-108.
- Friedmann, E. I. (1982). Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert. *Science*, 215(4536), 1045-1053.
- Gao, K., Yu, H., & Brown, M. T. (2007). Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 89(2), 117-124.

- Garcés, I, López, P. L., Auqué, L. F., Chong, G., Valles, V., & Gimeno, M. J. (1996). Características geoquímicas generales del sistema salino del salar de Lllamará (Chile). *Estudios Geológicos*, 52(1-2), 23-35.
- Garcia-Pichel, F., & Castenholz, R. W. (1993). Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 163-169.
- Garcia-Pichel, F. (1998). Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 28(3), 321-347.
- Garcia-Pichel, F., Nübel, U., & Muyzer, G. (1998). The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology*, 169(6), 469-482.
- Garcia-Pichel, F., López-Cortés, A., & Nübel, U. (2001). Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1902-1910.
- Garcia-Veigas, J., Chong, G., & Pueyo, J. J. (1996). Mineralogy and geochemistry of the Salar Grande salt rock (I Región de Tarapacá, Chile): genetic implications.
- Garvie, L. A., Knauth, L. P., Bungartz, F., Klonowski, S., & Nash III, T. H. (2008). Life in extreme environments: survival strategy of the endolithic desert lichen *Verrucaria rubrocincta*. *Naturwissenschaften*, 95(8), 705-712.
- Golubic, S., Friedmann, E. I., & Schneider, J. (1981). The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Research*, 51(2), 475-478.
- Gomariz, M., Martínez-García, M., Santos, F., Rodríguez, F., Capella-Gutiérrez, S., Gabaldón, T., ... & Antón, J. (2015). From community approaches to single-cell genomics: the discovery of ubiquitous hyperhalophilic *Bacteroidetes* generalists. *The ISME journal*, 9(1), 16-31.
- Gómez, F., Rodríguez-Manfredi, J. A., Rodríguez, N., Fernández-Sampedro, M., Caballero-Castrejón, F. J., & Amils, R. (2012). Habitability: Where to look for life? Halophilic habitats: Earth analogs to study Mars habitability. *Planetary and Space Science*, 68(1), 48-55.
- González, A. L., Fariña, J. M., Pinto, R., Pérez, C., Weathers, K. C., Armesto, J. J., & Marquet, P. A. (2011). Bromeliad growth and stoichiometry: responses to atmospheric nutrient supply in fog-dependent ecosystems of the hyper-arid Atacama Desert, Chile. *Oecologia*, 167(3), 835-845.
- Gorbushina, A. A. (2007). Life on the rocks. *Environmental microbiology*, 9(7), 1613-1631.

- Gramain, A., Díaz, G. C., Demergasso, C., Lowenstein, T. K., & McGenity, T. J. (2011). Archaeal diversity along a subterranean salt core from the Salar Grande (Chile). *Environmental microbiology*, 13(8), 2105-2121.
- Grant, W. D., Kamekura, M., Ventosa, A. & McGenity, T. J. (2001) Order Halobacteriales. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, vol. 1 (ed. D. R. Boone & R. W. Castenholz), pp. 294–300. New York: Springer
- Grant, W. D. (2004). Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1448), 1249-1267.
- Griffith, J. D., Willcox, S., Powers, D. W., Nelson, R., & Baxter, B. K. (2008). Discovery of abundant cellulose microfibers encased in 250 Ma Permian halite: a macromolecular target in the search for life on other planets. *Astrobiology*, 8(2), 215-228.
- Großkopf, R., Janssen, P. H., & Liesack, W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and environmental microbiology*, 64(3), 960-969.
- Guillitte O., Dreesen R. (1995). Laboratory chamber studies and petrographical analysis as bioreceptivity assessment tools of building materials. *Sci. Total Environ.*, 167: 365-74
- Guillitte, O. (1995). Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Science of the total environment*, 167(1), 215-220.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., & Plemenitaš, A. (2000). Hypersaline waters in salterns–natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(3), 235-240.
- Hajnos, M., Lipiec, J., Świeboda, R., Sokołowska, Z., & Witkowska-Walczak, B. (2006). Complete characterization of pore size distribution of tilled and orchard soil using water retention curve, mercury porosimetry, nitrogen adsorption, and water desorption methods. *Geoderma*, 135, 307-314.
- Hall, K., Guglielmin, M., & Strini, A. (2008). Weathering of granite in Antarctica: I. Light penetration into rock and implications for rock weathering and endolithic communities. *Earth Surface Processes and Landforms*, 33(2), 295-307.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. (2004). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, art. 4

- Han, T., Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2003). Effects of intense PAR and UV radiation on photosynthesis, growth and pigmentation in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(6), 649-654.
- Harel, Y., Ohad, I., & Kaplan, A. (2004). Activation of photosynthesis and resistance to photoinhibition in cyanobacteria within biological desert crust. *Plant Physiology*, 136(2), 3070-3079.
- Hartley, A. J., Chong, G., Houston, J., & Mather, A. E. (2005). 150 million years of climatic stability: evidence from the Atacama Desert, northern Chile. *Journal of the Geological Society*, 162(3), 421-424.
- Haynes, RH (1990) Ethics and planetary engineering. I. Ecce ecopoeisis: playing God on Mars. In: Macniven D (ed) *Moral expertise*. Routledge, London, pp 161–183
- He, Y. Y., & Häder, D. P. (2002). Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(10), 729-736.
- Herbert, R. A. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends in biotechnology*, 10, 395-402.
- Herrera, A., Cockell, C. S., Self, S., Blaxter, M., Reitner, J., Thorsteinsson, T., Arp, G., Droese, W., & Tindle, A. G. (2009). A cryptoendolithic community in volcanic glass. *Astrobiology*, 9(4), 369-381.
- Herrmann, H., HÄDER, D. P., & Ghetti, F. (1997). Inhibition of photosynthesis by solar radiation in *Dunaliella salina*: relative efficiencies of UV-B, UV-A and PAR. *Plant, Cell & Environment*, 20(3), 359-365.
- Herut B, Collier R, Krom MD (2002) The role of dust in supplying nitrogen and phosphorus to the Southeast Mediterranean. *Limnol Oceanogr* 47:870–878
- Heusinkveld, B. G., Jacobs, A. F. G., Holtslag, A. A. M., & Berkowicz, S. M. (2004). Surface energy balance closure in an arid region: role of soil heat flux. *Agricultural and Forest Meteorology*, 122(1), 21-37.
- Horath, T., & Bachofen, R. (2009). Molecular characterization of an endolithic microbial community in dolomite rock in the Central Alps (Switzerland). *Microbial ecology*, 58(2), 290-306.
- Horneck, G., Rettberg, P., Reitz, G., Wehner, J., Eschweiler, U., Strauch, K., ... & Baumstark-Khan, C. (2001). Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on panspermia. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31(6), 527-547.

- Horneck, G. (2003). Could life travel across interplanetary space? Panspermia revisited. *Evolution on planet Earth: the impact of the physical environment*, 109-127.
- Houston, J., & Hartley, A. J. (2003). The central Andean west- slope rainshadow and its potential contribution to the origin of hyper-aridity in the Atacama Desert. *International Journal of Climatology*, 23(12), 1453-1464.
- Houston, J. (2006). Variability of precipitation in the Atacama Desert: its causes and hydrological impact. *International Journal of Climatology*, 26(15), 2181-2198.
- Hubbard, G. S., Naderi, F. M., & Garvin, J. B. (2002). Following the water, the new program for Mars exploration. *Acta Astronautica*, 51(1), 337-350.
- Huber, T., Faulkner, G., & Hugenholtz, P. (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20(14), 2317-2319.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannon, B. J. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4399-4406.
- Hughes, K. A., & Lawley, B. (2003). A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts. *Environmental Microbiology*, 5(7), 555-565.
- Javor, B. (2012). *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Jehlička, J., Edwards, H. G. M., & Oren, A. (2013). Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and Bacteria: a Raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106, 99-103.
- Jones, E. G., & Lineweaver, C. H. (2010). To what extent does terrestrial life “follow the water”? *Astrobiology*, 10(3), 349-361.
- Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* 54:305–308
- Kanekar, P. P., Kanekar, S. P., Kelkar, A. S., & Dhakephalkar, P. K. (2012). Halophiles–Taxonomy, diversity, physiology and applications. In *Microorganisms in Environmental Management* (pp. 1-34). Springer Netherlands.

- Karsten, U., & Holzinger, A. (2014). Green algae in alpine biological soil crust communities: acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration. *Biodiversity and conservation*, 23(7), 1845-1858.
- Kaštovský, J., & Johansen, J. R. (2008). *Mastigocladus laminosus* (Stigonematales, Cyanobacteria): phylogenetic relationship of strains from thermal springs to soil-inhabiting genera of the order and taxonomic implications for the genus. *Phycologia*, 47(3), 307-320.
- Kates, M. Biology of halophilic bacteria, part II. Membrane lipids of extreme halophiles: Biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia* 1993, 49, 1027–1036.
- Kelt, D. A. (2011). Comparative ecology of desert small mammals: a selective review of the past 30 years. *Journal of Mammalogy*, 92(6), 1158-1178.
- Kemp, P. F., & Aller, J. Y. (2004). Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(2), 161-177.
- Kerker, S. (2004). Ecology of hypersaline microorganisms. In *Marine Microbiology*. Chapter 5 (pp. 37-47). National Institute of Oceanography Panaji.
- Kharroub, K., Lizama, C., Aguilera, M., Boulahrouf, A., Campos, V., Ramos-Cormenzana, A., & Monteoliva-Sánchez, M. (2008). *Halomicrobium katesii* sp. nov., an extremely halophilic archaeon. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(10), 2354-2358.
- Kidron, G. J., Herrnstadt, I., & Barzilay, E. (2002). The role of dew as a moisture source for sand microbiotic crusts in the Negev Desert, Israel. *Journal of Arid Environments*, 52(4), 517-533.
- Kish, A., Kirkali, G., Robinson, C., Rosenblatt, R., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., & DiRuggiero, J. (2009). Salt shield: intracellular salts provide cellular protection against ionizing radiation in the halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum* NRC - 1. *Environmental microbiology*, 11(5), 1066-1078.
- Kish, A., & DiRuggiero, J. (2012). DNA replication and repair in halophiles. In *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* (pp. 163-198). Springer Netherlands.
- Kühl, M., Holst, G., Larkum, A. W., & Ralph, P. J. (2008). Imaging of oxygen dynamics within the endolithic algal community of the massive coral *Porites lobata* (Dana). *Journal of Phycology*, 44, 541-550.
- Kuhlman, K. R., Venkat, P., La Duc, M. T., Kuhlman, G. M., & McKay, C. P. (2008). Evidence of a microbial community associated with rock varnish at Yungay, Atacama Desert, Chile. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012), 113(G4).

- Kumar, R., Patel, D. D., Bansal, D. D., Mishra, S., Mohammed, A., Arora, R., ... & Tripathi, R. P. (2010). Extremophiles: Sustainable resource of natural compounds-extremolytes. In Sustainable Biotechnology (pp. 279-294). Springer Netherlands.
- Kushner, D. J., & Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In: Halophilic bacteria, 1, 109-140. (Rodriguez Valera, E, ed.). Boca Raton, CRC Press.
- Lacap, D. C., Warren-Rhodes, K. A., McKay, C. P., & Pointing, S. B. (2011). Cyanobacteria and chloroflexi-dominated hypolithic colonization of quartz at the hyper-arid core of the Atacama Desert, Chile. *Extremophiles*, 15(1), 31-38.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, pp 115–175
- Lange, W. (1976). Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(8), 1181-1185.
- Lange, O. L., Büdel, B., Meyer, A., & Kilian, E. (1993). Further evidence that activation of net photosynthesis by dry cyanobacterial lichens requires liquid water. *The Lichenologist*, 25(02), 175-189.
- Lange, O. L., Meyer, A., Zellner, H., & Heber, U. (1994). Photosynthesis and water relations of lichen soil crusts: field measurements in the coastal fog zone of the Namib Desert. *Functional Ecology*, 253-264.
- Lange, O. L., Green, T. A., & Heber, U. (2001). Hydration - dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance?. *Journal of experimental botany*, 52(363), 2033-2042.
- Langlet, M., Nadaud, F., Benali, M., Pezron, I., Saleh, K., Guigon, P., & Metlas-Komunjer, L. (2011). Kinetics of dissolution and recrystallization of sodium chloride at controlled relative humidity. *Kona*, 29(168), 2011.
- Lanyi, J. K., & Balashov, S. P. (2008). Xanthorhodopsin: a bacteriorhodopsin-like proton pump with a carotenoid antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(7), 684-688.
- Leigh JA (2002) Evolution of energy metabolism. In Staley JT, Reysenbach A-L (eds) *Biodiversity of microbial life*. Wiley-Liss, NY pp 103-120

- Leuko, S., Goh, F., Ibáñez-Peral, R., Burns, B. P., Walter, M. R., & Neilan, B. A. (2008). Lysis efficiency of standard DNA extraction methods for *Halococcus* spp. in an organic rich environment. *Extremophiles*, 12(2), 301-308.
- Lineweaver, C. H., & Chopra, A. (2012). The habitability of our earth and other earths: astrophysical, geochemical, geophysical, and biological limits on planet habitability. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 40(1), 597.
- Litchfield, C. D. (1998). Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & planetary science*, 33(4), 813-819.
- Lizama, C., Monteoliva-Sánchez, M., Prado, B., Ramos-Cormenzana, A., Weckesser, J., & Campos, V. (2001). Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the “Salar de Atacama”, Chile. *Systematic and applied microbiology*, 24(3), 464-474.
- Lizama, C., Monteoliva-Sánchez, M., Suárez-García, A., Roselló-Mora, R., Aguilera, M., Campos, V., & Ramos-Cormenzana, A. (2002). *Halorubrum tebenquichense* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(1), 149-155.
- López, P. L., Auqué, L. F., Garcés, I., & Chong, G. (1999). Características geoquímicas y pautas de evolución de las salmueras superficiales del Salar de Llamará, Chile. *Revista geológica de Chile*, 26(1), 89-108.
- López-López, A., Benlloch, S., Bonfá, M., Rodríguez-Valera, F. & Mira, A. (2007). Intragenomic 16S rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to different temperatures. *J Mol Evol* 65, 687–696.
- López-López, A., Richter, M., Peña, A., Tamames, J., & Roselló-Móra, R. (2013). New insights into the archaeal diversity of a hypersaline microbial mat obtained by a metagenomic approach. *Systematic and applied microbiology*, 36(3), 205-214.
- Lowenstein, T. K., & Hardie, L. A. (1985). Criteria for the recognition of salt-pan evaporites. *Sedimentology*, 32(5), 627-644.
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440.
- Lundin, A. (2000). Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods in enzymology*, 305, 346-370.

- Maestre, F. T., Bowker, M. A., Cantón, Y., Castillo-Monroy, A. P., Cortina, J., Escolar, C., ... & Martínez, I. (2011). Ecology and functional roles of biological soil crusts in semi-arid ecosystems of Spain. *Journal of arid environments*, 75(12), 1282-1291.
- Mager, D. M., & Thomas, A. D. (2011). Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: a review of their role in dryland soil processes. *Journal of Arid Environments*, 75(2), 91-97.
- Magnusson, S. H., Fine, M., & Köhl, M. (2007). Light microclimate of endolithic phototrophs in the scleractinian corals *Montipora monasteriata* and *Porites cylindrica*. *Marine Ecology Progress Series*, 332, 119-128.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- Margheri, M. C., Ventura, S., Kaštovský, J., & Komárek, J. (2008). The taxonomic validation of the cyanobacterial genus *Halothece*. *Phycologia*, 47(5), 477-486.
- Marion, G. M., Fritsen, C. H., Eicken, H., & Payne, M. C. (2003). The search for life on Europa: limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues. *Astrobiology*, 3(4), 785-811.
- Martin, S. T. (2000). Phase transitions of aqueous atmospheric particles. *Chemical Reviews*, 100(9), 3403-3454.
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., ... & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 102-112.
- Matthes, U., Turner, S. J., & Larson, D. W. (2001). Light attenuation by limestone rock and its constraint on the depth distribution of endolithic algae and cyanobacteria. *International Journal of Plant Sciences*, 162(2), 263-270.
- Mazor, G., Kidron, G. J., Vonshak, A., & Abieliovich, A. (1996). The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. *FEMS Microbiology Ecology*, 21(2), 121-130.
- McCord, T. B., Hansen, G. B., Fanale, F. P., Carlson, R. W., Matson, D. L., Johnson, T. V., ... & Granahan, J. C. (1998). Salts on Europa's surface detected by Galileo's near infrared mapping spectrometer. *Science*, 280(5367), 1242-1245.
- McCready, S., & Marcello, L. (2003). Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum*. *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 694-698.

- McGenity, T. J., Gemmell, R. T., Grant, W. D., & Stan-Lotter, H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environmental Microbiology*, 2(3), 243-250.
- McKay, C. P. (2001). The search for a second genesis of life in our Solar System. In *First Steps in the Origin of Life in the Universe* (pp. 269-277). Springer Netherlands.
- McKay, C. P., Friedmann, E. I., Gómez-Silva, B., Cáceres-Villanueva, L., Andersen, D. T., & Landheim, R. (2003). Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997-1998. *Astrobiology*, 3(2), 393-406.
- McLoughlin, N., Brasier, M. D., Wacey, D., Green, O. R., & Perry, R. S. (2007). On biogenicity criteria for endolithic microborings on early Earth and beyond. *Astrobiology*, 7(1), 10-26.
- Middleton, N., & D. Thomas (1997) *World Atlas of Desertification*, Second edition. UNEP/Arnold, London
- Miller A. (1976). The climate of Chile. In *World Survey of Climatology*, Vol. 12: Climate of Central and South America. Edited by W. Schwerdfeger, Elsevier, Amsterdam, pp. 113–145.
- Möhlenhoff, P., Müller, L., Gorbushina, A. A., & Petersen, K. (2001). Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS microbiology letters*, 195(2), 169-173.
- Moreira-Muñoz, A. (2011). The Extravagant Physical Geography of Chile. In *Plant Geography of Chile* (pp. 3-45). Springer Netherlands.
- Mottl, M. J., Glazer, B. T., Kaiser, R. I., & Meech, K. J. (2007). Water and astrobiology. *Chemie der Erde-Geochemistry*, 67(4), 253-282.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(6), 414-421.
- Mustard, J. F., Murchie, S. L., Pelkey, S. M., Ehlmann, B. L., Milliken, R. E., Grant, J. A., ... & Wolff, M. (2008). Hydrated silicate minerals on Mars observed by the Mars Reconnaissance Orbiter CRISM instrument. *Nature*, 454(7202), 305-309.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700.

- Muyzer, G., S. Hottenträger, A. Teske, and C. Wawer. (1995). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities, p. 3.4.4.1–3.4.4.22. In A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*, 2nd ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 317-322.
- Nagy, M. L., Pérez, A., & Garcia-Pichel, F. (2005). The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument, AZ). *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), 233-245.
- Navarro-González, R., Rainey, F.A., Molina, P., Bagaley, D.R., Hollen, B.J., de la Rosa, J., Small, A.M., Quinn, R.C., Grunthaner, F.J., Cáceres, L., Gomez-Silva, B., and McKay, C.P. (2003) Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science* 302, 1018–1021
- Nealson, K. H., & Conrad, P. G. (1999). Life: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 354(1392), 1923-1939.
- Neilson, J. W., Quade, J., Ortiz, M., Nelson, W. M., Legatzki, A., Tian, F., ... & Maier, R. M. (2012). Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Extremophiles*, 16(3), 553-566.
- Nienow, J. A., McKay, C. P., & Friedmann, E. I. (1988). The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: light in the photosynthetically active region. *Microbial Ecology*, 16(3), 271-289.
- Nienow, J. A., & Friedmann, E. I. (1993). Terrestrial lithophytic (rock) communities. *Antarctic microbiology*, 343-412.
- Nienow, J. A., Friedmann, E. I., & Ocampo - Friedmann, R. (2003). Endolithic microorganisms in arid regions. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*.
- Nienow J A (2009). Extremophiles: dry environments (including cryptoendoliths). Pages 159-173 in Schaechter M, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, Oxford.
- Ninari, N., & Berliner, P. R. (2002). The role of dew in the water and heat balance of bare loess soil in the Negev Desert: quantifying the actual dew deposition on the soil surface. *Atmospheric Research*, 64(1), 323-334.

- Norton, C. F. & Grant, W. D. 1988 Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1365–1373.
- Odum EP (1971) *Fundamentals of Ecology*, 3rd edn. W.B. Saunders, Philadelphia
- Ojha, L., Wilhelm, M. B., Murchie, S. L., McEwen, A. S., Wray, J. J., Hanley, J., ... & Chojnacki, M. (2015). Spectral evidence for hydrated salts in recurring slope lineae on Mars. *Nature Geoscience*.
- Okin G, Mahowald N, Chadwick O, Artaxo P (2004) Impact of desert dust on the biogeochemistry of phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Biogeochem Cycles* 18:1–9
- Omelson, C. R., Pollard, W. H., & Ferris, F. G. (2006). Environmental controls on microbial colonization of high Arctic cryptoendolithic habitats. *Polar Biology*, 30(1), 19-29.
- Omelson, C. R. (2008). Endolithic microbial communities in polar desert habitats. *Geomicrobiology Journal*, 25(7-8), 404-414.
- Omeregíe, E. O., Crumbliss, L. L., Bebout, B. M., & Zehr, J. P. (2004). Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbya* sp. and *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2119-2128.
- Onofri, S., Selbmann, L., De Hoog, G. S., Grube, M., Barreca, D., Ruisi, S., & Zucconi, L. (2007a). Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Advances in Space Research*, 40(11), 1657-1664.
- Onofri, S., Zucconi, L., Selbmann, L., de Hoog, S., de los Ríos, A., Ruisi, S., & Grube, M. (2007b). Fungal associations at the cold edge of life. In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments* (pp. 735-757). Springer Netherlands.
- Oren, A. (1994). The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(4), 415-439.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(2): 334-348.
- Oren A. (2000). Salts and brines. In: Whitton BA and M Potts (Eds.), *Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 281 – 306.
- Oren, A., & Rodríguez-Valera, F. (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 123-130.

- Oren, A. (2002a). Halophilic microorganisms and their environments (Vol. 5). Springer Science & Business Media.
- Oren, A. (2002b). Pigments of halophilic microorganisms. In Halophilic microorganisms and their environments (Vol. 5), p 173-206. Springer Science & Business Media.
- Oren, A. (2005). A hundred years of Dunaliella research: 1905–2005. *Saline systems*, 1(2), 1-14.
- Oren, A. (2006). The order halobacteriales. In *The prokaryotes* (pp. 113-164). Springer New York.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4(2), 13.
- Oren, A. (2011a). Ecology of halophiles. In *Extremophiles Handbook* (pp. 343-361). Springer Japan.
- Oren, A. (2011b). Diversity of halophiles. In *Extremophiles Handbook* (pp. 309-325). Springer Japan.
- Oren, A. (2011c). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental microbiology*, 13(8), 1908-1923.
- Oren, A. (2013). *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS microbiology letters*, 342(1), 1-9.
- Oren, A. (2014). Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 1-10.
- Oren, A. (2015). Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), 781-798.
- Ortlieb, L. (1995). Eventos El Niño y episodios lluviosos en el Desierto de Atacama: el registro de los dos últimos siglos. *Bulletin de l'Institut Français d' Etudes Andines*, Vol. 24, No. 3, 519-537
- Osterloo, M. M., Hamilton, V. E., Bandfield, J. L., Glotch, T. D., Baldrige, A. M., Christensen, P. R., ... & Anderson, F. S. (2008). Chloride-bearing materials in the southern highlands of Mars. *Science*, 319(5870), 1651-1654.
- Paerl, H. W., Pinckney, J. L., & Steppe, T. F. (2000). Cyanobacterial–bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environmental Microbiology*, 2(1), 11-26.

- Pagaling, E., Wang, H., Venables, M., Wallace, A., Grant, W. D., Cowan, D. A., ... & Heaphy, S. (2009). Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Applied and environmental microbiology*, 75(18), 5750-5760.
- Papke, R. T. (2009). A critique of prokaryotic species concepts. In *Horizontal Gene Transfer* (pp. 379-395). Humana Press.
- Papke RT, White E, Reddy P et al. (2011) A Multilocus Sequence Analysis (MLSA) approach to Halobacteriales phylogeny and taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 2984–2995
- Parnell, J., Cullen, D., Sims, M. R., Bowden, S., Cockell, C. S., Court, R., ... & Vago, J. (2007). Searching for life on Mars: selection of molecular targets for ESA's aurora ExoMars mission. *Astrobiology*, 7(4), 578-604.
- Pedrós-Alió, C. (2012). The rare bacterial biosphere. *Annual review of marine science*, 4, 449-466.
- Peña, A., Valens, M., Santos, F., Buczolits, S., Antón, J., Kämpfer, P., ... & Rosselló-Mora, R. (2005). Intraspecific comparative analysis of the species *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 9(2), 151-161.pae1
- Peña, A., Teeling, H., Huerta-Cepas, J., Santos, F., Yarza, P., Brito-Echeverría, J., ... & Anton, J. (2010). Fine-scale evolution: genomic, phenotypic and ecological differentiation in two coexisting *Salinibacter ruber* strains. *The ISME journal*, 4(7), 882-895.
- Pentecost, A. (1993). Field relationships between scytonemin density, growth, and irradiance in cyanobacteria occurring in low illumination regimes. *Microbial ecology*, 26(2), 101-110.
- Piacentini, R. D., Cede, A., & Bárcena, H. (2003). Extreme solar total and UV irradiances due to cloud effect measured near the summer solstice at the high-altitude desertic plateau Puna of Atacama (Argentina). *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics*, 65(6), 727-731.
- Pituka EV, Hoover RB, Tang J. (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol*; 33: 183-209.
- Pointing, S. B., Warren- Rhodes, K. A., Lacap, D. C., Rhodes, K. L., & McKay, C.P . (2007). Hypolithic community shifts occur as a result of liquid water availability along environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts. *Environmental microbiology*, 9(2), 414-424.
- Pointing, S. B., & Belnap, J. (2012). Microbial colonization and controls in dryland systems. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 551-562.

- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews*, 58(4), 755.
- Potts, M. (1999). Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 34(04), 319-328.
- Potts, M. (2001). Desiccation tolerance: a simple process?. *Trends in microbiology*, 9(11), 553-559.
- Preston, L. J., & Dartnell, L. R. (2014). Planetary habitability: lessons learned from terrestrial analogues. *International Journal of Astrobiology*, 13(01), 81-98.
- Prosser, J. I., Bohannan, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., ... & Young, J. P. W. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 384-392.
- Proteau, P. J., Gerwick, W. H., Garcia-Pichel, F., & Castenholz, R. (1993). The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia*, 49(9), 825-829.
- Pueyo, J. J., Chong, G., & Jensen, A. (2001). Neogene evaporites in desert volcanic environments: Atacama Desert, northern Chile. *Sedimentology*, 48(6), 1411-1431.
- R. Macelroy (1974) Some comments on the evolution of extremophiles *Biosystems*, Vol. 6, No. 1., pp. 74-75,
- Rampelotto, P. H. (2013). Extremophiles and Extreme Environments. *Life*, 3(3), 482-485.
- Rao, B., Liu, Y., Wang, W., Hu, C., Dunhai, L., & Lan, S. (2009). Influence of dew on biomass and photosystem II activity of cyanobacterial crusts in the Hopq Desert, northwest China. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(12), 2387-2393.
- Rech JA., Quade J., Hart WS. (2003). Isotopic evidence for the source of Ca and S in soil gypsum, anhydrite and calcite in the Atacama Desert, Chile. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 575–586
- Rech, J. A., Currie, B. S., Shullenberger, E. D., Dunagan, S. P., Jordan, T. E., Blanco, N., ... & Houston, J. (2010). Evidence for the development of the Andean rain shadow from a Neogene isotopic record in the Atacama Desert, Chile. *Earth and Planetary Science Letters*, 292(3), 371-382.

- Rennó, N. O., Bos, B. J., Catling, D., Clark, B. C., Drube, L., Fisher, D., ... & Young, S. M. (2009). Possible physical and thermodynamical evidence for liquid water at the Phoenix landing site. *Journal of Geophysical Research: Planets* (1991–2012), 114(E1).
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 17(1), 208-212.
- Reysenbach, A. L., Liu, Y., Banta, A. B., Beveridge, T. J., Kirshtein, J. D., Schouten, S., ... & Voytek, M. A. (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature*, 442(7101), 444-447.
- Ridame C, Guieu C (2002) Saharan input of phosphate to the oligotrophic water of the open western Mediterranean Sea. *Limnol Oceanogr* 47:856–869
- Risacher, F., Alonso, H., & Salazar, C. (2003). The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Reviews*, 63(3), 249-293.
- Robinson, C. K., Wierzos, J., Black, C., Crits-Christoph, A., Ma, B., Ravel, J., Ascaso, C., Artieda, O., Valea, S., Roldán, M., Gómez-Silva, B., & Diruggiero, J. (2013). Microbial diversity and the presence of algae in halite endolithic communities are correlated to atmospheric moisture in the hyper-arid zone of the Atacama Desert. *Environmental microbiology*.
- Roh, S. W., Abell, G. C., Kim, K. H., Nam, Y. D., & Bae, J. W. (2010). Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends in biotechnology*, 28(6), 291-299.
- Roldán, M., Ascaso, C., & Wierzos, J. (2014). Fluorescent fingerprints of endolithic phototrophic cyanobacteria living within halite rocks in the Atacama Desert. *Applied and environmental microbiology*, 80(10), 2998-3006.
- Roselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- Rothrock, M. J., & Garcia-Pichel, F. (2005). Microbial diversity of benthic mats along a tidal desiccation gradient. *Environmental microbiology*, 7(4), 593-601.
- Rothschild, L. J. (1990). Earth analogs for Martian life. Microbes in evaporites, a new model system for life on Mars. *Icarus*, 88(1), 246-260.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.

- Rothschild, L. (2007). Extremophiles: defining the envelope for the search for life in the universe. *Planetary Systems and the Origins of Life*, 3, 113.
- Rubio-Portillo, E., Souza-Egipsy, V., Ascaso, C., de los Rios Murillo, A., Ramos-Esplá, A. A., & Antón, J. (2014). Eukarya associated with the stony coral *Oculina patagonica* from the Mediterranean Sea. *Marine genomics*, 17, 17-23.
- Ruisi, S., Barreca, D., Selbmann, L., Zucconi, L., & Onofri, S. (2007). Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6(1-3), 127-141.
- Rundel, P. W., Dillon, M. O., Palma, B., Mooney, H. A., Gulmon, S. L., & Ehleringer, J. R. (1991). The phytogeography and ecology of the coastal Atacama and Peruvian deserts. *Aliso*, 13(1), 1-49.
- Ryan, W.B.F., S.M. Carbotte, J.O. Coplan, S. O'Hara, A. Melkonian, R. Arko, R.A. Weissel, V. Ferrini, A. Goodwillie, F. Nitsche, J. Bonczkowski, and R. Zemsky (2009), Global Multi-Resolution Topography synthesis, *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 10, Q03014, doi:10.1029/2008GC002332. <http://www.geomapapp.org/>
- Sancho, L. G., De la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Rios, A., Pintado, A., ... & Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology*, 7(3), 443-454.
- Schemenauer, R. S., & Cereceda, P. (1992). The quality of fog water collected for domestic and agricultural use in Chile. *Journal of Applied Meteorology*, 31(3), 275-290.
- Schenk, O., & Urai, J. L. (2004). Microstructural evolution and grain boundary structure during static recrystallization in synthetic polycrystals of sodium chloride containing saturated brine. *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 146(6), 671-682.
- Schinteie, R., & Brocks, J. J. (2014). Evidence for ancient halophiles? Testing biomarker syngeneity of evaporites from Neoproterozoic and Cambrian strata. *Organic Geochemistry*, 72, 46-58.
- Schlesinger, W. H., Pippen, J. S., Wallenstein, M. D., Hofmockel, K. S., Klepeis, D. M., & Mahall, B. E. (2003). Community composition and photosynthesis by photoautotrophs under quartz pebbles, southern Mojave Desert. *Ecology*, 84(12), 3222-3231.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.

- Schulz, N., Boisier, J. P., & Aceituno, P. (2012). Climate change along the arid coast of northern Chile. *International Journal of Climatology*, 32(12), 1803-1814.
- Selbmann, L., De Hoog, G. S., Mazzaglia, A., Friedmann, E. I., & Onofri, S. (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud Mycol*, 51, 1-32.
- Selbmann, L., Zucconi, L., Isola, D., & Onofri, S. (2014). Rock black fungi: excellence in the extremes, from the Antarctic to space. *Current genetics*, 1-11.
- Siddiqui, K.S., Thomas, T. 2008. *Protein Adaptation in Extremophiles*: New York: Nova Biomedical Books
- Sigler, W. V., Bachofen, R., & Zeyer, J. (2003). Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environmental microbiology*, 5(7), 618-627.
- Singh, S. P., Häder, D. P., & Sinha, R. P. (2010). Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing research reviews*, 9(2), 79-90.
- Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2008). UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*, 174(3), 278-289.
- Smith, P. H., Tamppari, L. K., Arvidson, R. E., Bass, D., Blaney, D., Boynton, W. V., ... & Zent, A. P. (2009). H₂O at the Phoenix landing site. *Science*, 325(5936), 58-61.
- Souza-Egipsy, V., Ascaso, C., & Sancho, L. G. (2002). Water distribution within terricolous lichens revealed by scanning electron microscopy and its relevance in soil crust ecology. *Mycological Research*, 106(11), 1367-1374.
- Squyres, S. W., Grotzinger, J. P., Arvidson, R. E., Bell, J. F., Calvin, W., Christensen, P. R., ... & Soderblom, L. A. (2004). In situ evidence for an ancient aqueous environment at Meridiani Planum, Mars. *Science*, 306(5702), 1709-1714.
- Stahl DA, Tiedje JM (2002) *Microbial ecology and genomics: a crossroads of opportunity*. Report Amer Acad Microbiol, ASM Press, Washington DC
- Stan-Lotter, H., Radax, C., Gruber, C., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Wieland, H., ... & Kargl, G. (2002). Astrobiology with haloarchaea from Permo-Triassic rock salt. *International Journal of Astrobiology*, 1(4), 271-284.
- Stevenson, A., Burkhardt, J., Cockell, C. S., Cray, J. A., Dijksterhuis, J., Fox-Powell, M., ... & Hallsworth, J. E. (2015). Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life. *Environmental microbiology*, 17(2), 257-277.

- Stivaletta, N., & Barbieri, R. (2008). Endoliths in terrestrial arid environments: implications for astrobiology. In *From Fossils to Astrobiology* (pp. 319-333). Springer Netherlands.
- Stivaletta, N., Barbieri, R., Cevenini, F., & Lopez-Garcia, P. (2011). Physicochemical conditions and microbial diversity associated with the evaporite deposits in the Laguna de la Piedra (Salar de Atacama, Chile). *Geomicrobiology Journal*, 28(1), 83-95.
- Stivaletta, N., Barbieri, R., & Billi, D. (2012). Microbial colonization of the salt deposits in the driest place of the Atacama Desert (Chile). *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42(2-3), 187-200.
- Stoertz, G.E. and Ericksen, G.E., (1974). Geology of salars in northern Chile. U.S. Geol. Surv., Prof. Pap. 811, 65 pp
- Stomeo, F., Valverde, A., Pointing, S. B., McKay, C. P., Warren-Rhodes, K. A., Tuffin, M. I., ... & Cowan, D. A. (2013). Hypolithic and soil microbial community assembly along an aridity gradient in the Namib Desert. *Extremophiles*, 17(2), 329-337.
- Stotzky, G. (1966). Influence of clay minerals on microorganisms: III. Effect of particle size, cation exchange capacity, and surface area on bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 12(6), 1235-1246.
- Sutherland, W. J., Freckleton, R. P., Godfray, H. C. J., Beissinger, S. R., Benton, T., Cameron, D. D., ... & Wiegand, T. (2013). Identification of 100 fundamental ecological questions. *Journal of ecology*, 101(1), 58-67.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., ... & Horikoshi, K. (2008). Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10949-10954.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tehei, M., Franzetti, B., Maurel, M. C., Vergne, J., Hountondji, C., & Zaccari, G. (2002). The search for traces of life: the protective effect of salt on biological macromolecules. *Extremophiles*, 6(5), 427-430.
- Tenchov, B.; Vesico, E.M.; Sprott, G.D.; Zeidel, M.L.; Mathai, J.C. Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 10016–10023.

- Thompson, J. N., Reichman, O. J., Morin, P. J., Polis, G. A., Power, M. E., Sterner, R. W., ... & Strauss, S. Y. (2001). Frontiers of Ecology As ecological research enters a new era of collaboration, integration, and technological sophistication, four frontiers seem paramount for understanding how biological and physical processes interact over multiple spatial and temporal scales to shape the earth's biodiversity. *BioScience*, 51(1), 15-24.
- Tindall, B. J., Rosselló-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266.
- Toporski, J., & Steele, A. (2002, November). The relevance of bacterial biomarkers in astrobiological research. In *Exo-Astrobiology* (Vol. 518, pp. 239-242).
- Torsvik, V., Sørheim, R., & Goksøyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(3-4), 170-178.
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.
- Tracy, C. R., Streten- Joyce, C., Dalton, R., Nussear, K. E., Gibb, K. S., & Christian, K. A. (2010). Microclimate and limits to photosynthesis in a diverse community of hypolithic cyanobacteria in northern Australia. *Environmental microbiology*, 12(3), 592-607.
- Treiman, A. H., Gleason, J. D., & Bogard, D. D. (2000). The SNC meteorites are from Mars. *Planetary and Space Science*, 48(12), 1213-1230.
- Vainio, E. J., & Hantula, J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological research*, 104(08), 927-936.
- Van Elsas, J. D., Duarte, G. F., Keijzer-Wolters, A., & Smit, E. (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 133-151.
- Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M. T., & Kern, R. (2003). ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *Journal of microbiological methods*, 52(3), 367-377.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504-544.

- Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In Symposia-Society for General Microbiology (Vol. 66, p. 223). Cambridge; Cambridge University Press; 1999.
- Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., & Papke, R. T. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current opinion in microbiology*, 25, 80-87.
- Veste, M., Heusinkveld, B. G., Berkowicz, S. M., Breckle, S. W., Littmann, T., & Jacobs, A. F. G. (2008). Dew formation and activity of biological soil crusts. In *Arid Dune Ecosystems* (pp. 305-318). Springer Berlin Heidelberg.
- Vítek, P., Edwards, H. G. M., Jehlička, J., Ascaso, C., De los Ríos, A., Valea, S., ... & Wierzchos, J. (2010). Microbial colonization of halite from the hyper-arid Atacama Desert studied by Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1922), 3205-3221.
- Vítek, P., Jehlička, J., Edwards, H. G., Hutchinson, I., Ascaso, C., & Wierzchos, J. (2012). The miniaturized Raman system and detection of traces of life in halite from the Atacama Desert: some considerations for the search for life signatures on Mars. *Astrobiology*, 12(12), 1095-1099.
- Vítek, P., Jehlička, J., Ascaso, C., Mašek, V., Gómez-Silva, B., Olivares, H., & Wierzchos, J. (2014). Distribution of scytonemin in endolithic microbial communities from halite crusts in the hyperarid zone of the Atacama Desert, Chile. *FEMS microbiology ecology*, 90(2), 351-366.
- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., & Powers, D. W. (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407(6806), 897-900.
- Walker J J & Pace N R (2007a). Endolithic microbial ecosystems. *Annual Review of Microbiology* 61:331-347.
- Walker, J. J., & Pace, N. R. (2007b). Phylogenetic composition of Rocky Mountain endolithic microbial ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 73(11), 3497-3504.
- Warren-Rhodes K A, Rhodes K L, Pointing S B, Ewing S A, Lacap D C, Gómez-Silva B, Amundson R, Friedmann E I & McKay C P (2006). Hypolithic cyanobacteria, dry limit of photosynthesis, and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert. *Microbial Ecology* 52:389-398.
- Weischet, W. (1975). Las condiciones climáticas del desierto de Atacama como desierto extremo de la Tierra. *Revista Norte Grande*. I (3 - 4): 363-373.

- Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS microbiology reviews*, 24(3), 263-290.
- Whitford, W. G. (2002). Ecology of desert systems. Chapter 3 Characterization of Desert Climates. 3.5 Microclimate. Academic Press.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6578–6583
- Wierzchos, J., & Ascaso, C. (1994). Application of back-scattered electron imaging to the study of the lichen-rock interface. *Journal of Microscopy*, 175(1), 54-59.
- Wierzchos, J., & Ascaso, C. (2001). Life, decay and fossilisation of endolithic microorganisms from the Ross Desert, Antarctica. *Polar Biology*, 24(11), 863-868.
- Wierzchos, J., & Ascaso, C. (2002). Microbial fossil record of rocks from the Ross Desert, Antarctica: implications in the search for past life on Mars. *International Journal of Astrobiology*, 1(01), 51-59.
- Wierzchos, J., De los Rios, A., Sancho, L. G., & Ascaso, C. (2004). Viability of endolithic microorganisms in rocks from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica established by confocal and fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 216(1), 57-61.
- Wierzchos, J., Sancho, L. G., & Ascaso, C. (2005). Biomineralization of endolithic microbes in rocks from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica: implications for microbial fossil formation and their detection. *Environmental Microbiology*, 7(4), 566-575.
- Wierzchos J, Ascaso C & McKay CP (2006) Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. *Astrobiology* 6, 415-422.
- Wierzchos J, Camara B, De Los Rios A, Davila AF, Almazo IMS, Artieda O, Wierzchos K, Gomez-Silva B, McKay C, Ascaso C (2011) Microbial colonization of Ca-sulfate crusts in the hyperarid core of the Atacama Desert: implications for the search for life on Mars. *Geobiology* 9:44–60
- Wierzchos, J., de los Ríos, A., & Ascaso, C. (2012a). Microorganisms in desert rocks: the edge of life on Earth. *International Microbiology*, 15, 173-183.
- Wierzchos, J., Davila, A. F., Sánchez-Almazo, I. M., Hajnos, M., Swieboda, R., & Ascaso, C. (2012b). Novel water source for endolithic life in the hyperarid core of the Atacama Desert. *Biogeosciences Discussions*, 9(3), 3071-3098.

- Wierzchos J, Davila AF, Artieda O, Cámara-Gallego B, de los Ríos A, Nealson KH, Valea S, Teresa García-González M & Ascaso C (2013) Ignimbrite as a substrate for endolithic life in the hyper-arid Atacama Desert: Implications for the search for life on Mars. *Icarus* 224, 334-346.
- Wierzchos, J., DiRuggiero, J., Vítek, P., Artieda, O., Souza-Egipsy, V., Škaloud, P., ... & Ascaso, C. (2015). Adaptation strategies of endolithic chlorophototrophs to survive the hyperarid and extreme solar radiation environment of the Atacama Desert. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Wynn-Williams, D. D., & Edwards, H. G. (2002). *Environmental UV radiation: biological strategies for protection and avoidance* (pp. 245-260). Springer Berlin Heidelberg.
- Xu, J. (2006). Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular ecology*, 15(7), 1713-1731.
- Zarraonaindia, I., Smith, D. P., & Gilbert, J. A. (2013). Beyond the genome: community-level analysis of the microbial world. *Biology & philosophy*, 28(2), 261-282.
- Zimmerman, N., Izard, J., Klatt, C., Zhou, J., & Aronson, E. (2014). The unseen world: environmental microbial sequencing and identification methods for ecologists. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(4), 224-231.
- Ziolkowski, L. A., Wierzchos, J., Davila, A. F., & Slater, G. F. (2013). Radiocarbon Evidence of Active Endolithic Microbial Communities in the Hyperarid Core of the Atacama Desert. *Astrobiology*, 13(7), 607-616.
- Zorzano, M. P., Mateo-Marti, E., Prieto-Ballesteros, O., Osuna, S., & Renno, N. (2009). Stability of liquid saline water on present day Mars. *Geophysical Research Letters*, 36(20).
- Zvyagintseva IS, Gerasimenko LM, Kostrikina NA, Bulygina ES & Zavarzin GA (1995) Interaction of halobacteria and cyanobacteria in a halophilic cyanobacterial community. *Mikrobiologiya* 64: 252–258

Figuras y Tablas

Índice de figuras

<i>Figura 1: Árbol de la vida: relaciones filogenéticas establecidas a partir de la comparación de la secuencia de los genes que codifican para el ARN ribosómico (modelo de 3 dominios propuesto por Woese et al., 1990).</i>	21
<i>Figura 2: Relación de organismos extremófilos con distintas áreas de investigación y sectores socioeconómicos</i>	23
<i>Figura 3: Diagrama de fases del agua en función de la temperatura y la presión. No se incluyen los efectos producidos por la adición de sales en la disminución del punto de fusión y el aumento de punto de ebullición. Los números romanos expresan las 15 diferentes configuraciones estructurales que puede adoptar el hielo. La línea en rojo representa las condiciones terrestres a nivel del mar. Tomada de Wikipedia sin sobreescritura (contribución de Jeremy.rutman)</i>	24
<i>Figura 4: Diagrama de representación de la actividad colectiva (tasas de división celular y actividad metabólica) de los microorganismos en relación a la Temperatura (A) y la Actividad de Agua (B). Las líneas en rojo representan el rango observado en el que se produce división celular. La barra en negro representa el intervalo donde la mayor parte de la actividad microbiana observada en la Tierra tiene lugar. La línea de puntos naranja representa límites teóricos para el metabolismo celular (-33°C) y el límite que se sospecha para la actividad fisiológica del ADN ($a_w < 0.530$). La doble flecha naranja indicaría posibles extensiones en el rango al tener en cuenta escalas de tiempo mayores (decenas o cientos de años, aunque en este sentido hay muy pocos estudios). Modificado de Stevenson et al., 2015.</i>	25
<i>Figura 5. Distribución de los principales desiertos del planeta modificado de Kelt 2011.</i>	27
<i>Figura 6: Principales nichos microbianos en zonas áridas. El sombreado verde demarca la colonización y pretende ilustrar la continuidad de la misma en función del gradiente de aridez. Sobre la imagen se muestra a su vez la relación inversa entre el incremento del estrés xérico y la estabilidad del suelo, ligada en última instancia a los patrones de colonización. La riqueza de especies correlaciona negativamente con el incremento de la aridez mientras que la amenaza de extinción aumenta con el incremento del estrés xérico. Modificado de Pointing & Belnap, 2012.</i>	28
<i>Figura 7: Denominación de los diferentes hábitats litobióticos colonizados por microorganismos. Epilítico (superficie de la roca); hipolítico (parte inferior de la roca en contacto con el suelo); endolítico (principal hábitat en los desiertos extremadamente áridos, y puede ser dividido en criptoendolítico, casmoendolítico e hipoendolítico). Esquema en Wierzechos et al. 2012a.</i>	32
<i>Figura 8: División político-administrativa del norte de Chile. Tomado de Cereceda et al., 2009.</i>	47
<i>Figura 9: Principales unidades fisiográficas del Norte de Chile. Las manchas negras y grises se corresponden con distintos salares (véase Fig. 17). Adaptado de Risacher et al., 2003.</i>	48
<i>Figura 10: Geomorfología del Norte de Chile. A) Reconstrucción 3d del desierto de Atacama GeomapApp Ryan et al., 2009. B) Vista de perfil, tomado de Cereceda et al., 2008. C) Transecto longitudinal, tomado de Stoertz & Ericksen, 1974.</i>	49
<i>Figura 11: De izquierda a derecha. a) Mapa de distribución anual de precipitaciones. b) Mapa de evaporación potencial. c) Mapa de la diferencia entre pluviosidad y evaporación. d) Principales subdivisiones bioclimáticas del Desierto de Atacama.</i>	52
<i>Figura 12: a) Circulación atmosférica sobre América del Sur: Nótese el desplazamiento N-S de la zona de convergencia intertropical (ITCZ) Tomado de Moreira-Muñoz (2011). b) Mapa de distribución global de las corrientes oceánicas frías y cálidas. Compárese con mapa de distribución de los principales desierto del planeta Fig. 5. c) Detalle de la corriente de Humboldt frente a la costa de Chile y efecto de la sombra de lluvia.</i>	54
<i>Figura 13: Posiciones de América del Sur durante el Carbonífero tardío (300 ma), inicios del periodo Cretácico (120 ma) y durante el Eoceno (50 ma). Tomado de Moreira-Muñoz (2011).</i>	55

<i>Figura 14: Perfil esquemático del comportamiento de la masa de aire frente a la costa de Chile. Adaptado de Schultz et al., (2012).</i>	56
<i>Figura 15: Perfil geológico idealizado con las principales unidades geomorfológicas del Norte Grande de Chile (adaptado de Ortlieb, 1995).</i>	57
<i>Figura 16: Modelo esquemático de un salar que muestran los factores tectónicos, sedimentarios hidrológicos climáticos y biológicos implicados en la formación de salares. Tomado de Chong Díaz, 1988.</i>	58
<i>Figura 17: Mapa de distribución de los principales salares y lagos salinos del Norte de Chile. Tomado de Stoertz & Ericksen, 1974.</i>	59
<i>Figura 18: a) Esquema del proceso de deliquesencia de NaCl. Adsorción, condensación y disolución de agua sobre cristales higroscópicos. Tomado de Langlet et al., 2011. b) Curva de cambio de peso de una muestra de NaCl durante el incremento de humedad relativa línea continua. Humedad de equilibrio de NaCl 75% a 25 °C. La línea discontinua muestra el proceso estimado de eflorescencia. Humedad de cristalización de una solución 5M de NaCl 45% Modificado de Franzen & Mirwald 2009.</i>	62
<i>Figura 19: Rangos de concentración salina en la que se observan diferentes procesos metabólicos microbianos. En negro procesos descritos en estudios con cultivos puros. En blanco procesos detectados en la naturaleza como parte de medidas de actividad en ecosistemas hipersalinos. Nota: 360 gr·l⁻¹ es la concentración de saturación para NaCl. Tomado de Oren, 2011.</i>	67
<i>Figura 20: Imágenes de diferentes nódulos de sal en distintos salares de la Depresión Central (a) y del área de la Costa (b) del desierto de Atacama.</i>	71
<i>Figura 21: A) Mapa de localización de la diferentes áreas de muestreo a lo largo de Norte de Chile (YU) Yungay, (LL) Lllamará, (SGN) Salar Grande Norte, (SGS) Salar Grande Sur. B) Perfil topográfico Oeste-Este y distancia lineal de las diferentes localizaciones de muestreo en función la costa (Oeste). C) y D) ampliaciones de las áreas de muestreo que muestran las posibles vías de entrada de las nieblas costeras. Fuente GeoMapApp GMRT (Ryan et al., 2009; http://www.geomapapp.org/)</i>	72
<i>Figura 22: Nódulos de halita de las diferentes áreas de muestreo incluidas en este estudio. a) y b) Yungay. Colonización en banda. c) y d) Lllamará. Colonización en banda. e) y f) Salar Grande Norte. Colonización en volumen. g) y h) Salar Grande Sur. Colonización en banda (recuadro) y en volumen (círculo).</i>	75
<i>Figura 23: Esquema resumen de las metodologías y técnicas de análisis utilizadas en la Tesis Doctoral.</i>	76
<i>Figura 24: Estaciones microclimáticas. A) Estación colocada en Yungay. B) Detalle de la disposición de los distintos sensores. En negro sensor PAR, en rojo T/HR exterior, en verde T/HR interior y CE interior, en azul Precipitación. C) Detalle de la colocación de los sensores de T/HR y CE en el exterior e interior de la roca. En rojo detalle del sensor CE colocado en superficie. D) Estación colocada en Salar Grande Sur.</i>	79
<i>Figura 25: Estudio del ambiente lumínico en el interior de los nódulos a) Diseño de estudio de calidad de luz. b) Nódulo de Yungay iluminado por lámpara halógena de cuarzo-tungsteno. c) Corte transversal del nódulo de Yungay. d y e) Diseño del estudio de medición de cantidad de radiación PAR. f) Lámina fina. g) Paso de luz a través de la lámina fina.</i>	81
<i>Figura 26. Datos de radiación PAR a nivel de suelo en Yungay (izq) y Salar Grande Sur (dcha). Periodo de medición de 24 de enero de 2010 a 23 enero 2011. Toma de datos cada 30 min. Arriba serie anual continua. Abajo grafica de proyección diaria con todos los datos.</i>	93
<i>Figura 27: Neblinas en Salar Grande.</i>	94
<i>Figura 28: Series completas de los datos registrados cada 30 minutos durante el periodo desde el 23 de mayo de 2009 al 19 de abril de 2011 para la Humedad Relativa (a) y la Temperatura (b). En negro el valor medio diario para cada variable. (c) Describe el valor de la diferencia entre la temperatura del aire y el valor calculado para la temperatura del punto de rocío en el mismo instante de registro.</i>	96

Figura 29: Proyección de 24 h de todos los datos registrados cada media hora durante el periodo de 23 de mayo de 2009 al 19 de abril de 2011 en cada localización. En rojo los valores de temperatura y en azul los valores de humedad relativa. Línea continua exhibe una serie de datos diaria de un día interpretado como seco, en línea discontinua un día considerado húmedo. _____ 97

Figura 30. Resumen comparado de los valores mensuales y anuales de T^a (izq) y HR (dcha) en las 4 áreas de estudio. De arriba abajo, estadística mensual del valor medio diario, media de las máximas diarias, media de las mínimas diarias, valor medio de la oscilación diaria (valor máximo diario – valor mínimo diario). Periodo de medición desde el 23 de mayo de 2009 al 19 de abril de 2011 con registro cada 30 minutos. Gráficos de barra con valores anuales para los mismos valores de T (izq) y HR (centro) y el n° de horas acumuladas en distintos umbrales de HR (dcha), se corresponde con tabla 2. _____ 98

Figura 31. Clúster de dos vías con los valores anuales de temperatura y humedad relativa _____ 101

Figura 32: Aspectos de la porosidad de los nódulos de sal. a) Fragmento de nódulo de Salar Grande Norte. b) Detalle de la superficie e interior del nódulo. c) Micrografía de la estructura interna de los nódulos de sal obtenida por SEM-BSE (cedida por Dr Wierzechos. Descripción de la técnica en Wierzechos & Ascaso, 1994). Barra 200 μm . En gris los cristales de halita que muestran signos de disolución parcial. En negro los espacios entre cristales, Las flechas blancas muestran agregados de microorganismos. d) Micrografía obtenida por LT-SEM. Barra 20 μm . (H) cristales de NaCl, (S) salmuera (véase estudio por LT-SEM para su justificación), (P) poro con aire. _____ 103

Figura 33: Distribución comparada de tamaño de poro y grado de porosidad de nódulos de halita procedentes de las 4 áreas de estudio. Arriba curvas diferenciales obtenidas durante la inyección de mercurio. A la izquierda, los datos correspondientes a la zona superficial, a la derecha los que se corresponden con la zona colonizada. Abajo gráficos de barras que muestran el porcentaje de porosidad y el tamaño medio de los poros tanto de la zona superficial como la colonizada. El modelo de cálculo asume que los poros son cilíndricos. _____ 105

Figura 34: Series de datos de temperatura en el interior de los nódulos de sal obtenidos durante el periodo comprendido entre el 25 de enero y 26 de junio de 2010. En la columna de la izquierda se muestra la localización de Yungay a la derecha Salar Grande sur. A) comparación entre los valores medios, máximos y mínimos diario obtenidos en el interior del nódulo y la masa de aire inmediatamente adyacente a los nódulos en cada localización. B) Valores de la oscilación térmica diaria calculada dentro y fuera de cada nódulo. C) Proyección de 24 horas con los valores de la diferencia calculada de los valores registrados cada media hora de temperatura dentro y fuera del nódulo [$-(T^a \text{ fuera} - T^a \text{ dentro})$]. _____ 107

Figura 35: Registro de humedad relativa (RH) y conductividad eléctrica (CE) expresada en voltaje (V) en el interior y exterior de los nódulos en Yungay y Salar Grande Sur. Periodo de 25 de enero a 26 de junio de 2010. Cada pico en la gráfica equivale a un día. a) Humedad relativa dentro y fuera de un nódulo en Yungay. Obsérvese episodios secos (de duración variable entre 1-6 días en este estudio). b) CE dentro y fuera del mismo nódulo de Yungay. Obsérvese correspondencia con los valores de HR. c) Humedad Relativa dentro y fuera de un nódulo en Salar Grande Sur. _____ 109

Figura 36: Aspecto nocturno (izq) y diurno (dcha) del área de Salar Grande Sur. _____ 110

Figura 37: Temperatura del punto de rocío (dewpoint) y humedad absoluta (AH) en Yungay y Salar Grande Sur. Periodo de 25 de enero a 26 de junio de 2010. a) Temperatura interna del nódulo – temperatura punto de rocío de la masa de aire externa. Los valores negativos indicarían deposición por contacto. b) En negro, temperatura interna – temperatura de punto de rocío de la masa de aire interna. Valores en negativo indicarían condensación. Nótese correlación con la aparición de eventos secos. En gris, temperatura externa – temperatura de punto de rocío interna. c) Humedad absoluta en g/m³. En negro humedad absoluta a nivel de suelo. En rojo humedad absoluta en el interior de los nódulos. _____ 111

Figura 38: Eventos secos en Yungay y captación de agua por el nódulo. a) Serie semanal (4 de marzo de 2010 a 13 de marzo de 2010). b) Serie diaria (8 marzo de 2010). En ambas: línea punteada en azul se corresponde con la HR de deliquesencia para el NaCl. Por debajo de la línea continua azul se alcanza punto de rocío. _____ 113

Figura 39: Eflorescencias salinas sobre los nódulos. _____ 114

Figura 40: Estudio del ambiente lumínico en el interior de los nódulos. A) Evaluación cualitativa del espectro de luz registrado a distintas profundidades del nódulo. Las dos líneas que se muestran en cada profundidad se corresponden con los espectros de cada una de las lámparas (espectro ultravioleta y espectro visible e infrarrojo cercano. No se detectó transmisión de luz por debajo 14,43 mm. B) A la izquierda, intensidad de luz PAR detectada en láminas finas de nódulos de Yungay y SGS (6 y 9 mm de espesor respectivamente) húmedas y secas e iluminadas a una intensidad PAR de $2386,75 \pm 80,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} = \mu\text{E}$. A la derecha, intensidad PAR detectada al iluminar las láminas finas húmedas con intensidades crecientes de PAR ($188,57 \pm 4,82$; $662,31 \pm 16,72$; $1316,95 \pm 44,98$; $2169,08 \pm 71,36$; $2386,75 \pm 80,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

117

Figura 41: Micrografías obtenidas por microscopía estereoscópica de fragmentos de diferentes nódulos de sal colonizados y recogidos en cada área de muestreo. Colonización en banda a) Yungay y b) Lllamará. Los puntos de color oscuro se corresponden con agregados de microorganismos. La zona de colonización en este caso se concentra en torno a la interfase entre distintas estructuras de los nódulos. De arriba a abajo: superficie, estructura compacta (poco porosa), línea de acumulación de minerales arcillosos, estructura porosa. Colonización en volumen. c) Salar Grande Norte y d) Salar Grande Sur. Obsérvese como la colonización se dispone en amplias zonas de sal pura porosa En c) de arriba a abajo: superficie, capa de sales y minerales arcillosos densamente mezclados, halita pura porosa. e) Colonización en banda superficial de Salar Grande Sur, los agregados se encuentran mezclado con sales, minerales arcillosos y posiblemente otros detritos arrastrados por el viento. f) Esquema idealizado de los tipos de colonización: en Banda (izq), en Volumen (dcha). Los puntos verdes se corresponden con los agregados de microorganismos, las bandas marrones con minerales arcillosos.

119

Figura 42: Secciones finas de nódulos de halita. Microscopía de campo claro. a) y b) agrupaciones irregulares de agregados entre cristales de sal. c) agrupaciones de células individuales. d) agrupaciones lineales.

120

Figura 43: Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro y microscopía de contraste de interferencia diferencial. a) Micrografía que muestra diferentes estadios del ciclo vital de la cianobacteria. Véase descripción continuación en Fig. 44. b) Forma colonial de Salar Grande Sur. Las flechas blancas muestran la cubierta exterior colonial y la cubierta formada por células en el interior. c) Agregado cianobacterias de pequeño tamaño en Salar Grande Norte. Flecha roja = cianobacterias; Flechas negras = alga. d) Agregado en Lllamará. Nótese el grosor de las cubiertas. Signo > indica cianobacterias en distintos estadios de decoloración. e) Formas individuales y colonias pequeñas en Yungay. f) Microorganismos heterótrofos presentes en nódulos de Yungay. En todas: (*) = microorganismos heterótrofos. La numeración indica morfologías reconocidas entre los organismos asociados. Nota: las imágenes tienen resolución suficiente para su ampliación en la copia digital.

121

Figura 44: Modificación del esquema utilizado con permiso del Dr. Jan Kantosky que muestra los posibles diferentes estadios vitales de la cianobacteria presente en el interior de los nódulos de sal del desierto de Atacama. Partiendo de 1. las células se dividen por fisión binaria dentro de la cubierta externa que individualiza el agregado. 2. y 3. Sucesivas divisiones en tres planos (fisión múltiple) van generando agregados esféricos más o menos regulares de mayor tamaño, que se corresponden con la variedad de formas observadas mediante microscopía de campo claro y contraste de interferencia diferencial (Fig. 43). En algunos casos las células del agregado producen su propia cubierta externa manteniéndose en el interior de la cubierta original. 4. Formación de colonias con número variable de células. 5. Liberación de las células contenidas en la cubierta original y liberación de baeocitos no móviles que mantienen un tamaño similar a la de las células parenterales (diámetro en torno a los $3 \mu\text{m}$) (a), células individuales con su cubierta (b), o cuyo proceso de fisión comenzó en el agregado colonial (c). En ocasiones, las células que conformaban la colonia permanecen unidas tras la ruptura de la cubierta inicial.

122

Figura 45: Micrografías obtenidas por LT-SEM de halitas colonizadas (I). a) y b) Imágenes contextuales del microhábitat y la colonización en el interior de los nódulos. H: cristales de NaCl; A: espacio vacío; S: restos de salmuera; la flechas blancas indican el posicionamiento de la colonización microbiana. Barra = $20 \mu\text{m}$ y $50 \mu\text{m}$ respectivamente c) Detalle de Fig. 45b Agregado de cianobacterias embebido en la salmuera (S) junto a un poro (A) véase detalle de las redes. Barra = $10 \mu\text{m}$ d) Agregados embebidos en la salmuera (S) y posicionados junto a un poro (A) en Salar Grande. Barra = $20 \mu\text{m}$.

124

Figura 46: Micrografías obtenidas por LT-SEM de halitas colonizadas (II). a) Aglomeración de cianobacterianas (flecha blanca) embebidas en la salmuera y próximas a las paredes de un cristal de

halita. Barra = 20µm. b) micrografía de un agregado de cianobacterias (flecha blanca) adherido y ocupando todo el espacio entre los cristales de sal (H) junto a un poro (A). Barra = 20µm c) y d) Agregados adosados a cristales de halita (H) y próximos a minerales de arcilla (asterisco negro *). Las flechas negras indican microorganismos asociados a la cianobacteria. Barra = 20µm. _____ 125

Figura 47: Micrografías obtenidas por LT-SEM de halitas colonizadas (III). a) Detalle de la Fig. 45d, la flecha blanca exhibe las cubiertas externas de las cianobacterias. Barra = 10µm b) Colonia de múltiples agregados en Salar Grande Sur. Obsérvese los detalles de las cubiertas (flecha blanca). Las flechas negras indican microorganismos heterótrofos asociados a grupos de cianobacterias. Barra = 20µm. c-e) Diferentes estadios de hidratación de los agregados. c) HR = 75% 24h temperatura ambiente; d) HR= 20% 7 días y temperatura ambiente; e) HR= 10% 72h y en estufa a 60°C. _____ 126

Figura 48: Micrografías obtenidas por CSLM de agregados de cianobacterias (autofluorescencia roja) asociadas con microorganismos heterotróficos y EPS (señal en verde) en Yungay a) y Salar Grande Norte b). c) Reconstrucción 3D de uno de los agregados microbianos hallados en Salar Grande que muestra la organización espacial de los distintos microorganismos que los componen. d) Test de viabilidad, en verde microorganismos con membranas intactas (SYBR Green I) y en rojo aquellos que presentan daño en la membrana celular (marcados con yoduro de propidio). _____ 128

Figura 49: Microscopía de fluorescencia organismos autofluorescentes y marcados con DAPI. a) b) c) d) e) f) Muestran distintas agrupaciones de cianobacterias (señal en rojo y azul verdoso) y microorganismos no fotosintéticos (señal en azul), que aparecen numerados en las distintas imágenes, formando los agregados. Flechas blancas = cianobacterias con alto grado de viabilidad; Flechas abiertas = Cianobacterias inactivas o senescentes; Signo > = Cianobacterias no viables o muertas. * = célula de alga. g), dos tipos de sarcinas regulares (8 y 18) y agrupación de diplococos (3). h) Sarcina irregular de cocos (10). i) Bacilos de gran tamaño posiblemente espirilos (19). j) Bacilos curvados posiblemente vibrios (20) k) Agrupación de cocos en tétradas regulares (10). Nota: las imágenes tienen resolución suficiente para su ampliación en la copia digital. _____ 130

Figura 50: Microscopía electrónica de transmisión (I). A) Célula de cianobacteria que muestra los principales elementos ultraestructurales: tilacoides organizados paralelamente a la membrana y posibles gránulos de almacenamiento electrondensos, cubierta externa (barra), parte externa gruesa y electrondensa de la cubierta (flecha negra). B) Cianobacteria en fase de división Flecha negra indica membrana externa. C) Células de cianobacterias en Yungay completamente divididas y separadas por sus membranas externas. La flecha en blanco indica posibles EPS secretados por las cianobacterias que mantienen cohesionado los agregados. F) Agregado de cianobacterias en Salar Grande estrechamente unido con microorganismos heterótrofos íntimamente asociados (flechas negras). _____ 132

Figura 51: Microscopía electrónica de transmisión mostrando la asociación íntima de microorganismos heterótrofos con células de cianobacterias. A) y B) asociación de microorganismos heterótrofos (flechas negras) a células de cianobacteria (c) dañadas e incluso penetrando en su interior (B). C) y D) asociación de microorganismos heterótrofos (flechas negras) a células de cianobacteria (c) con características ultraestructurales correspondientes a células vivas. _____ 133

Figura 52: Perfiles obtenidos por PCR-DGGE de fragmentos de la región del gen que codifica para el ARNr 16S. a) Perfil correspondiente al dominio Arquea. Cebadores a109f y 515r g+c (358-398pb) b) Perfil correspondiente al dominio Bacteria. Cebadores 341f g+c y 907r (532-556pb). Señaladas con un cuadrado rojo a la izquierda las bandas que fueron cortadas. * Marcador electroforético. Nota: La colonización superficial de Salar Grande Sur (SGS-SUP) sólo presenta 3 carriles porque de los 5 nódulos utilizados en el análisis solo 3 presentaban este tipo de colonización. _____ 135

Figura 53: A) Esquema de presencia-ausencia de los distintos OTUs obtenidos por secuenciación de las principales bandas escindidas de DGGE. B) Diagrama de Venn que muestra el número de OTUS compartidos. C) Dendrograma con los resultados del análisis de similitud entre localizaciones basado en el índice de Sorensen (presencia/ausencia de OTUs). _____ 136

◀Figura 54: Análisis filogenético de las secuencias parciales de arqueas presentes en los nódulos de sal. Topología del árbol inferida mediante máxima verosimilitud (ML) bajo un modelo de sustitución GTR + Γ + I. Los valores de bootstrap (1000 replicas) por encima del 70 % se encuentran recogidos en los nodos del árbol. _____ 141

Figura 55: *Análisis filogenético de las secuencias parciales de bacterias presentes en los nódulos de sal. Topología del árbol inferida mediante máxima verosimilitud (ML) bajo un modelo de sustitución GTR + Γ + I. Los valores de bootstrap (1000 replicas) por encima del 70 % se encuentran recogidos en los nodos del árbol.* _____ **141**

Figura 56. *Estimación de la biomasa microbiana presente en los nódulos de halita. La biomasa se expresa en número de células por gramo de la zona de colonización.* _____ **142**

Índice de tablas

Tabla 1: *Tipología de organismos extremófilos en función del parámetro fisicoquímico dominante y ejemplo de hábitat. Adaptado de Rothschild & Mancinelli, (2001) y Cavicchioli (2002).* _____ **21**

Tabla 2. *Valores anuales de T^a y HR y el n° de horas acumuladas en distintos umbrales de HR.* _____ **98**

Tabla 3: *Datos de composición química de la zona colonizada de los nódulos de sal en las diferentes localizaciones de estudio.* _____ **102**

Tabla 4: *Correlaciones obtenidas entre las secuencias parciales de arqueas (358-398bp) y bacterias (532-556bp) con las secuencias presentes en la base de datos del Genbank* _____ **139**

Anexos

***Anexo I: Clasificación de zonas áridas y
concepto de aridez***

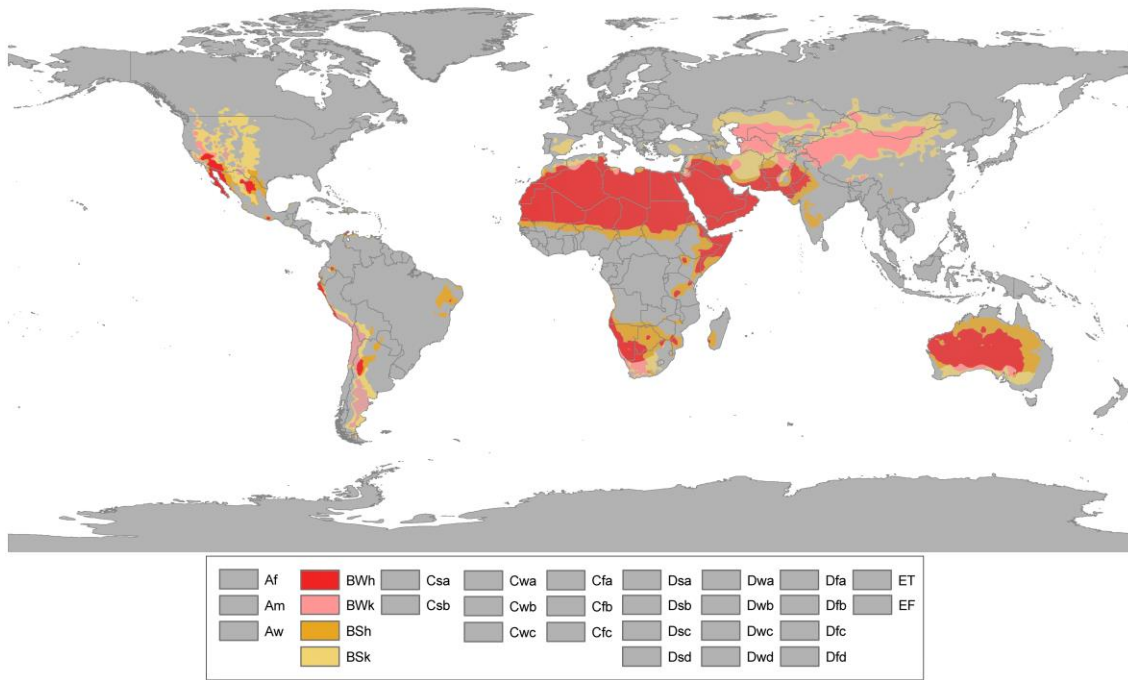
Zonas áridas en la clasificación bioclimática de Köppen-Geiger (1900)

Considerada como la primera clasificación cuantitativa de los climas del mundo, esta clasificación de carácter empírico sigue siendo a día de hoy uno de los métodos de catalogación climática más reconocidos y se encuentra en constante actualización. La clasificación de Köppen-Geiger reconoce los diferentes tipos de climas mediante la conjunción de los datos de las estaciones meteorológicas y los tipos de formaciones vegetales, ofreciendo una respuesta cartográfica a la organización de los ecosistemas. En un principio esta clasificación identifica cinco grandes grupos de climas, cuatro de ellos basados exclusivamente en la temperatura y el otro, el grupo de zonas secas (B), basado además en la precipitación.

Para la delimitación y clasificación de las zonas áridas, Köppen establece en un primer lugar un umbral P' que permite la diferenciación con respecto al resto de los grupos, y a continuación un sistema de nomenclatura basado en la precipitación y las características térmicas.

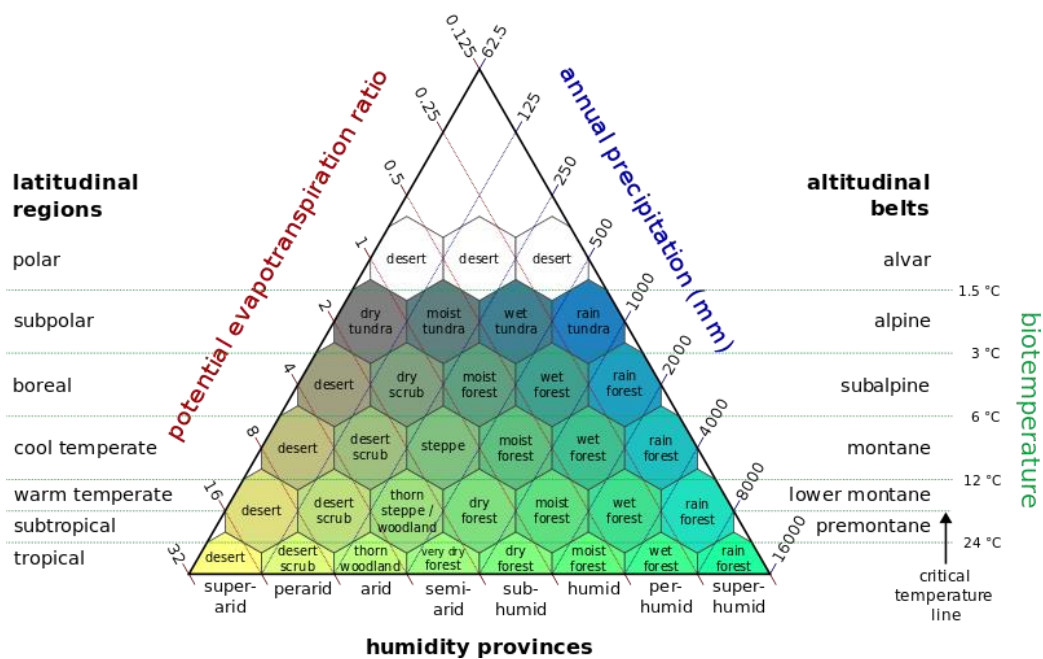
$P' = 2T$	si P se concentra en el Invierno	Zonas no secas	$P > P'$
$P' = 2T + 14$	si la distribución de P es uniforme	Zonas semiáridas (BS)	$T + 7 \leq P \leq P'$
$P' = 2T + 28$	si P se concentra en el Verano	Zonas áridas (BW)	$P < T + 7$

1º	2º	3º	4º	
B	-	-	-	Seco
	S	-	-	Semiáridas - Estepa
	W	-	-	Árido - Desierto
	-	h	-	Cálido - temperatura media anual $\geq 18^\circ\text{C}$
	-	k	-	Frío - temperatura media anual $< 18^\circ\text{C}$
	-	-	n	Subdivision de h para desiertos costeros influenciados por las corrientes marinas frías que presentan neblinas frecuentes e inviernos suaves



Zonas secas en la clasificación de Köppens

Si bien, Köppens no describe los ecosistemas polares (ET y EF) como desiertos, sus condiciones de falta de precipitaciones, la baja humedad del aire y que la temperatura raramente sube de los 0°C promueven que la escasez de agua disponible sea equivalente a los desiertos del grupo de B, hecho que queda mejor descrito en el sistema de zonas de vida Holdridge (1967).



Sistema de zonas de vida Holdridge

Índices de aridez

La aridez es el concepto que mejor define a los desiertos, y aunque en términos científicos no existe una definición objetiva, dado que su enfoque puede variar según cada investigador (meteorólogo, climatólogo, agrónomo, biólogo,...), la mayoría de los indicadores o índices de aridez intentan reflejar la **disponibilidad total de agua** mediante el balance entre la ganancia y la pérdida de agua que se produce en un sistema, y que se encuentra definido por la interacción entre la precipitación, la temperatura, la evaporación y la evapotranspiración. Sobre esta base, y bajo diferentes aproximaciones, se han desarrollado numerosos índices que expresan la falta de agua dentro de un sistema:

a) El criterio más sencillo, y a su vez el más imperfecto, es la utilización de los valores de precipitación mensuales o anuales obviando los efectos térmicos. Bajo esta aproximación se delimitan inicialmente los desiertos en función de si su precipitación anual no supera los 250mm (para algunos hasta 500mm), y su extensión queda relacionada con las isoyetas.

b) En segundo lugar se encuentran los índices de aridez que intentan balancear las precipitaciones caídas a lo largo del año con la temperatura como indicador de la capacidad de evaporación, y que se basan en la supuesta correlación positiva entre el aumento de la temperatura y la evapotranspiración. Por su diseño, la mayoría de estos índices presenta dificultades para describir la severidad de la aridez entre aquellos desiertos que no reciben ninguna precipitación a lo largo del año. A continuación algunos de los índices utilizados por la agencia meteorológica chilena

Índice o pluvi factorial de Lang (1925)

$$Pf = P/tm$$

P: precipitación media anual en mm

tm: temperatura media anual en °C

Valor de Pf	Zona
0-20	Desierto
20-40	Árida
40-60	Húmedas de estepa y sabana
60-100	Húmedas de bosques claros
100-160	Húmedas de grandes bosques
>160	Pérhumedas

Aplicado sobre todo en la descripción de suelos

Índice de áridez de De Martonne (1926)

$$Ia = P/[tm+10]$$

P : precipitación media anual en mm

tm : temperatura media anual en °C

Ia	Nos define las zonas:
0-5	Desiertos (Hiperárido)
5-10	Semidesierto (Arido)
10-20	Semiárido de tipo mediterráneo / Estepa
20-30	Subhúmeda
30-60	Húmeda
>60	Perhúmeda

Similar al índice anterior, es más apropiada para climas fríos al añadir una constante al denominador evitando, de esta manera, los valores negativos. El valor que se suma a la temperatura del denominador es el 10, valor que se cambia por el siete en la propuesta de delimitación de zonas húmedas y secas de Köppen. La fórmula puede ser aplicada usando los valores medios mensuales y multiplicando por doce

Cociente de Emberger (1932)

$$Q = 1000 \cdot P / ((M+m)/2) \cdot (M-m)$$

P: precipitación anual en mm

M: Temperatura máxima media del mes más caluroso (K)

m: Temperatura mínima media del mes más frío, (K)

Q	CLIMA
>90	Húmedo
90-50	Sub-húmedo
50-30	Semiárido
30-0	Árido

Índice de aridez de Knoch

$$Ik = n \cdot P / (100 \cdot (T + 10))$$

T = Temperatura anual en °C

P = Precipitación anual en mm

n = Número de días de lluvia en el año

Ik	Aridez:
0 < Ik < 25	Extrema
25 < Ik < 50	Severa
50 < Ik < 75	Normal
75 < Ik < 100	Moderada
100 < Ik	Pequeña

c) Un tercer enfoque vendría constituido por aquellos índices que usan como base conceptual el cálculo de la evapotranspiración potencial (ETP). Estos índices son los más utilizados en la actualidad en la clasificación de zonas áridas y permiten un mayor grado de detalle en el grado de humedad, pero al ser dependientes de estudios previos y multitud de parámetros, cuya medición real presenta gran dificultad, estos índices no están exentos de fallos.

Uno de los primeros y más importantes es el índice de humedad de Thornthwaite (Im) basado en la ETP del mismo autor (Thornthwaite 1948):

Índice de humedad de Thornthwaite (Im)

$$Im = (100s - 60d) / ETP$$

$$ETP = 16C(10Tm/I)^a$$

s=superavit de humedad *

d=déficit de humedad *

ETP= evapotranspiración potencial

C=coeficiente de luz diaria

Tm= Temperatura media mensual

a= exponente derivado del índice de calor I

$$I = \sum(Tm/5)^{1.51}$$

$$a = (67.5 \cdot 10^{-8} \cdot I^3) - (77.1 \cdot 10^{-6} \cdot I^2) + (0.0179 \cdot I) + (0.492)$$

TIPO	DESCRIPCION	CONDICION
E	Árido	$-40 \geq Im > -60$
D	Semiárido	$-20 \geq Im > -40$
C1	Seco subhúmedo	$0 \geq Im > -20$
C2	Subhúmedo	$20 \geq Im > 0$
B1	Húmedo	$40 \geq Im > 20$
B2		$60 \geq Im > 40$
B3		$80 \geq Im > 60$
B4		$100 \geq Im > 80$
A	Perhúmedo	$Im > 100$

* Ambas en valores anuales y calculadas a partir de los datos mensuales y tomando en cuenta el almacenamiento del suelo

Sobre la base de este índice de humedad, Meigs (1953) desarrolló una clasificación y una nomenclatura de zonas áridas para la UNESCO, en la que además se destaca el comportamiento térmico y la época de precipitaciones

Humedad

E = Hiperárido	Precipitación anual promedio < 25mm, con 12 meses consecutivos sin lluvia	$Im < -56$
A = Árido	Precipitación anual promedio entre 25 - 200 mm	$-56 \leq Im < -40$
S = Semiárido	Precipitación anual promedio entre 200 - 500 mm	$-40 \leq Im < -20$

Estación de precipitaciones

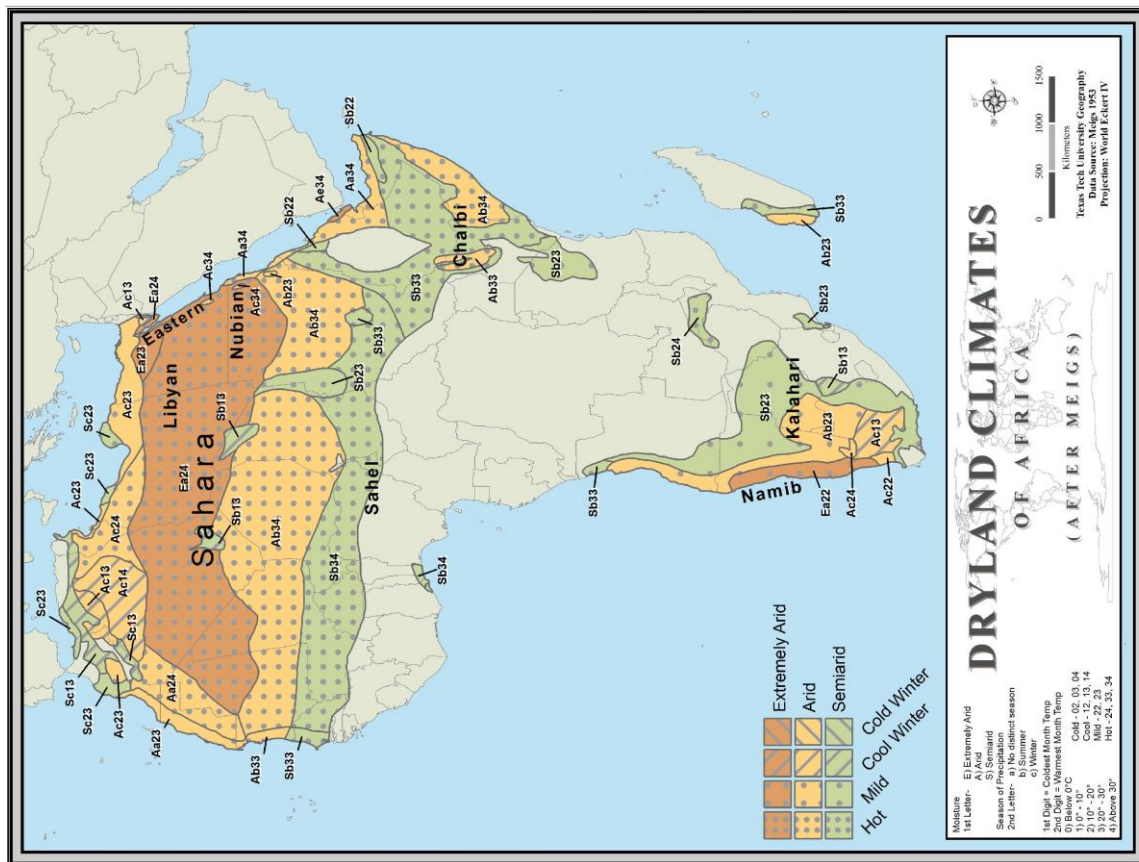
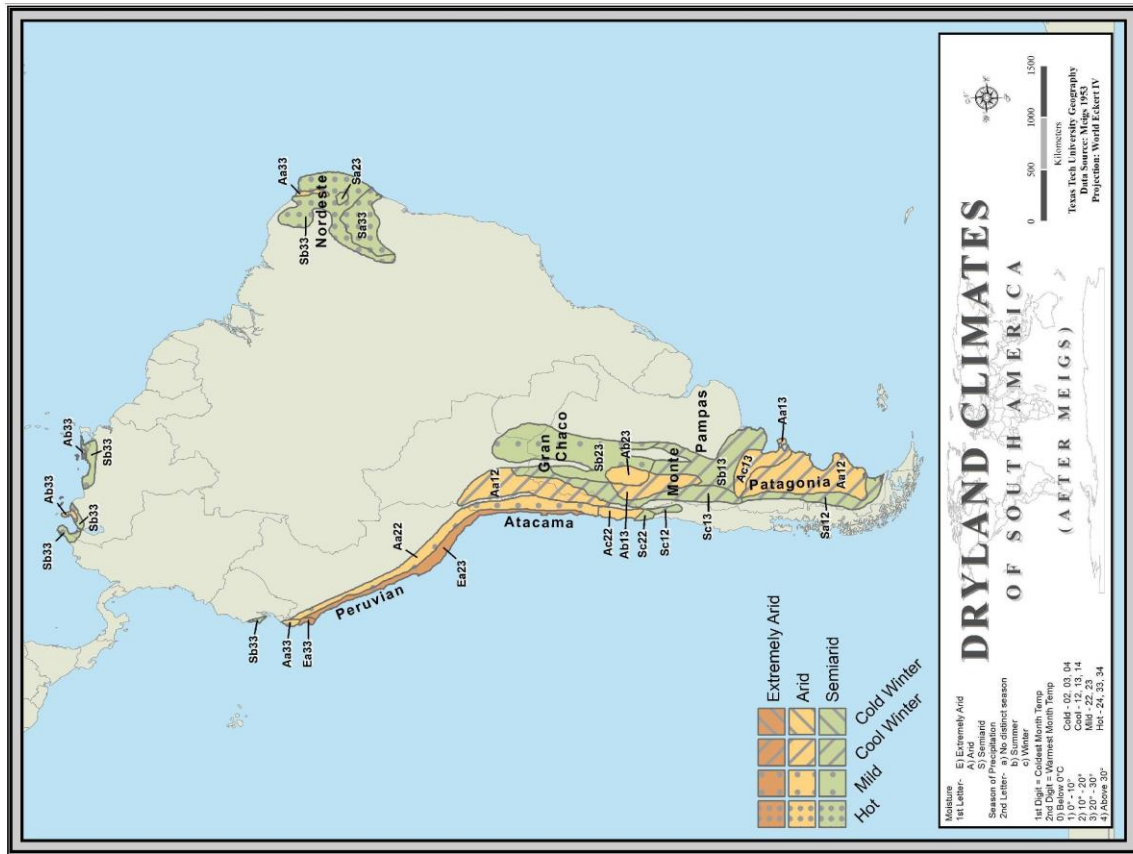
a =	No distingue estación
b =	Precipitaciones de verano
c =	Precipitaciones de invierno

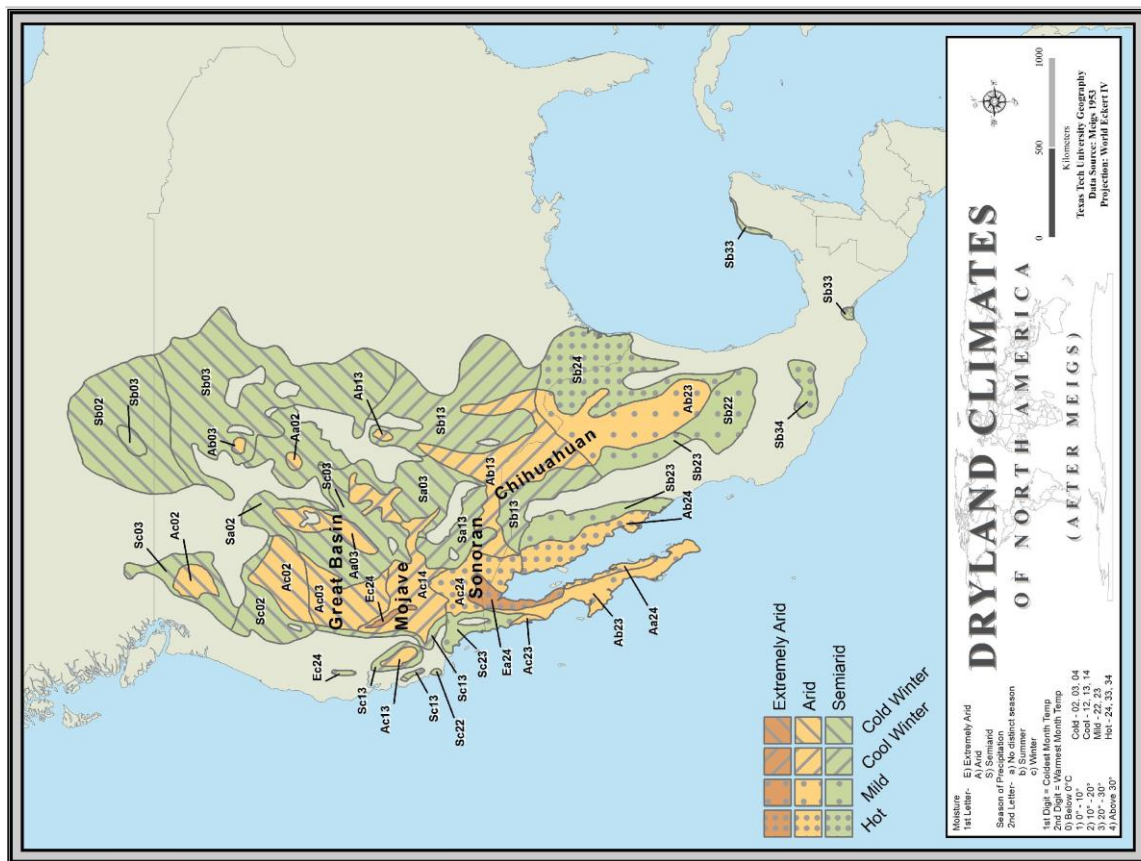
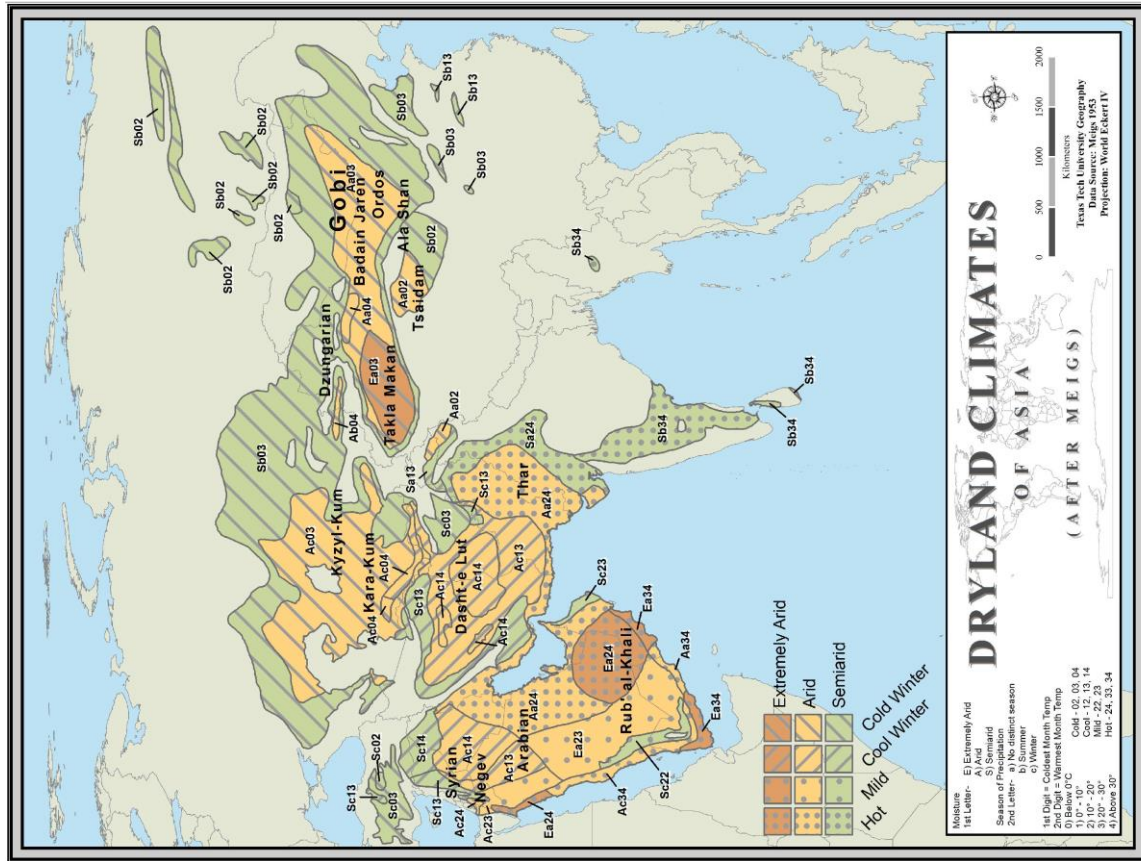
Temperatura

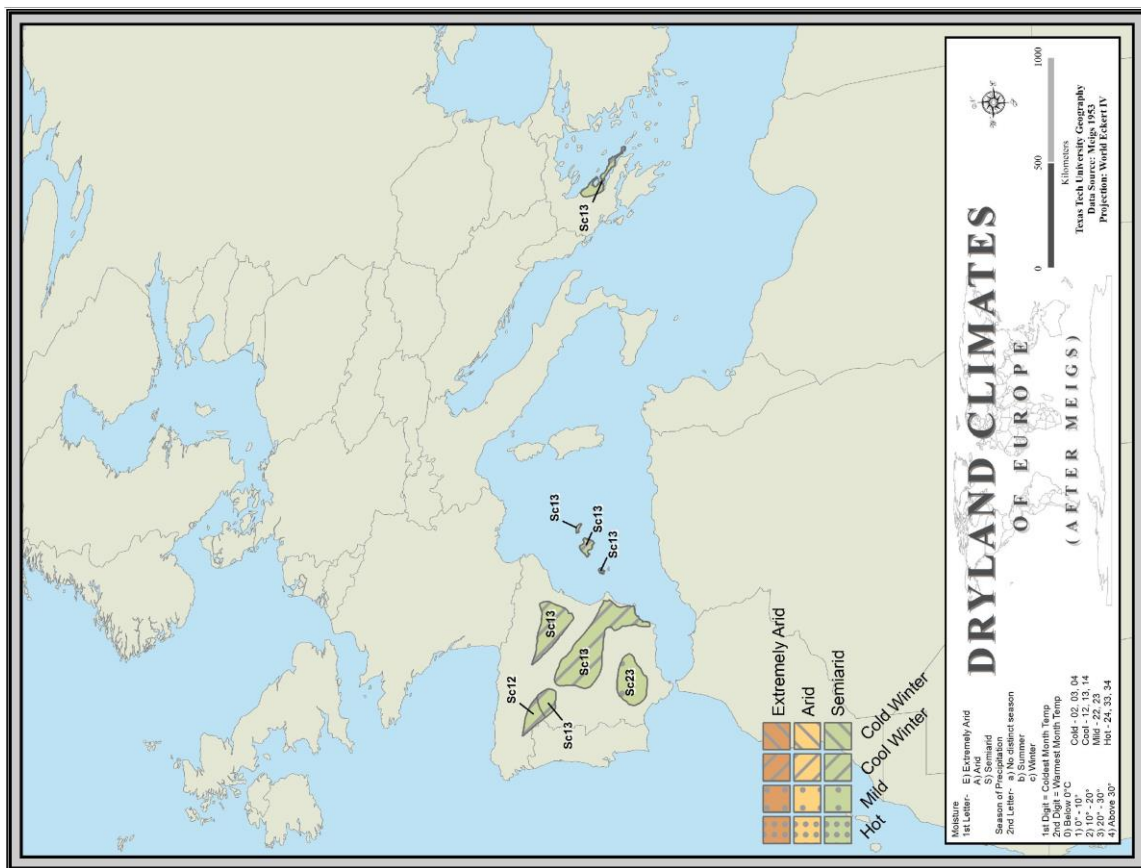
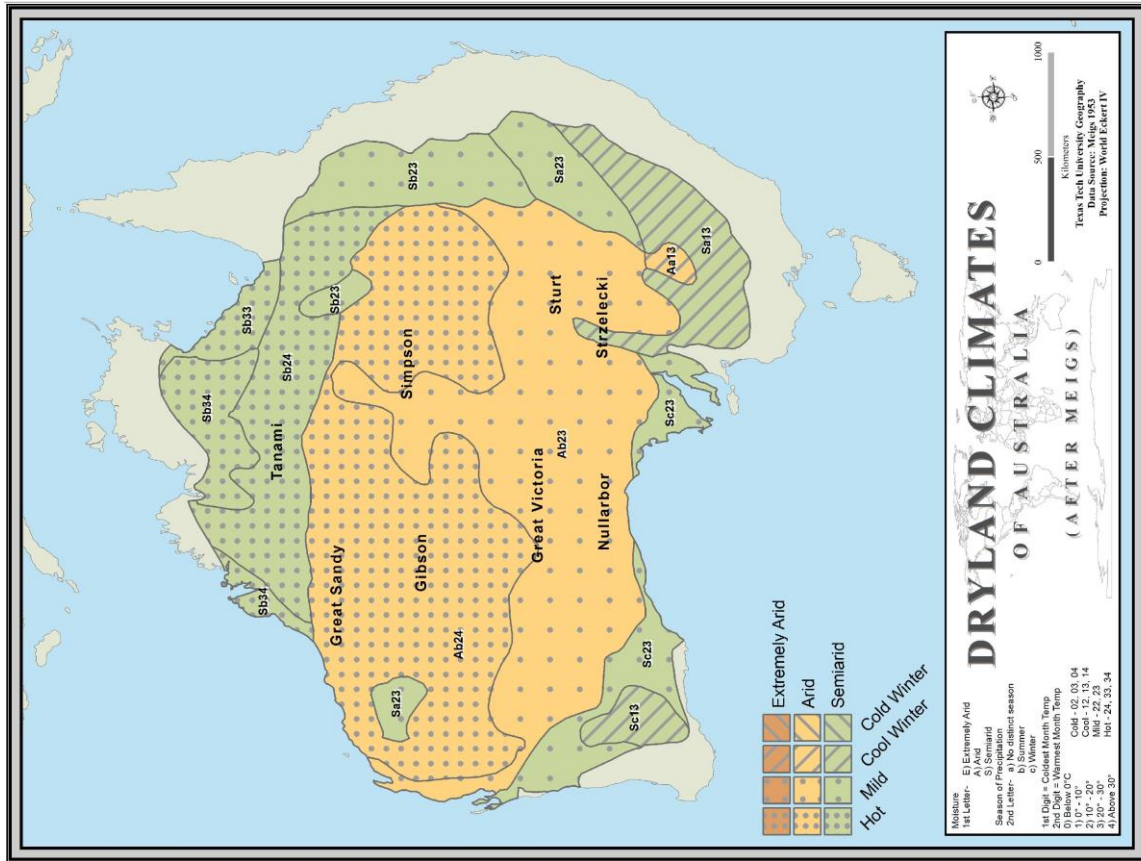
Primer dígito	Temperatura promedio del mes más frío	0-	< 0°C
Segundo dígito	Temperatura promedio del mes más cálido	1-	0 - 10 °C
		2-	10 - 20 °C
		3-	20 - 30 °C
		4-	> 30 °C

Características térmicas

Caliente	(24,33,34)
Apacible	(22,23)
Invierno fresco	(12,13,14)
Invierno frío	(02,03,04)

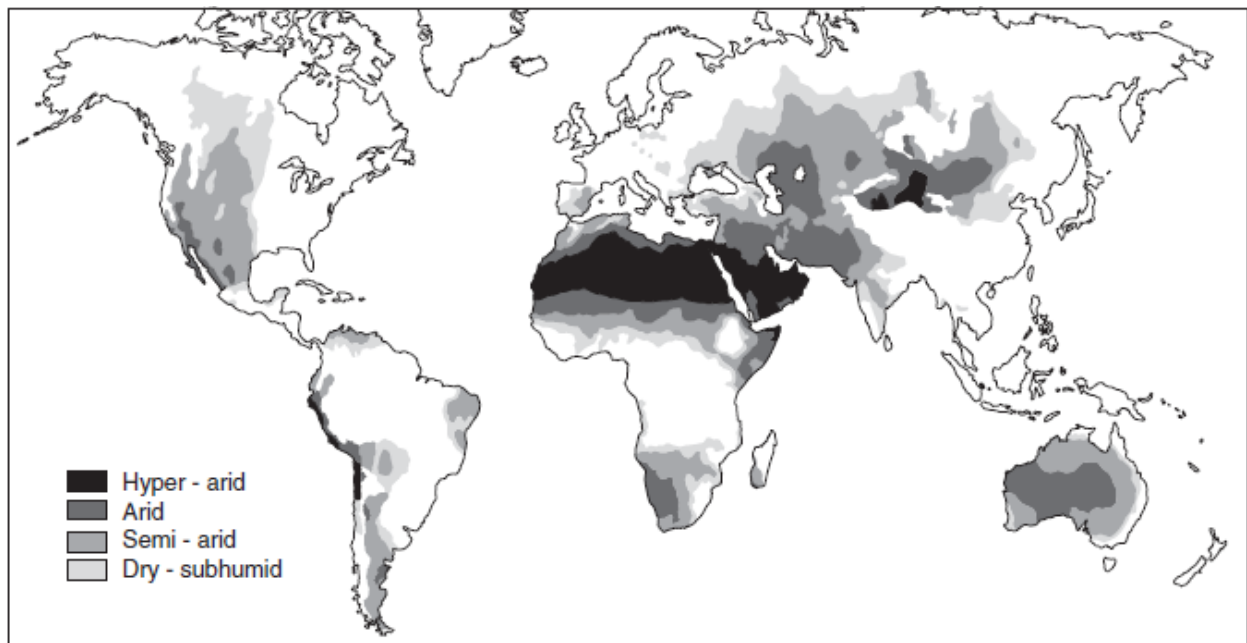






Hoy en día, la clasificación de más amplia aceptación, es la propuesta por el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP, 1992) y la Organización de las Naciones Unidas (FAO 1993) que se fundamenta en un índice de aridez conceptualmente más simple basado en la relación entre la precipitación anual promedio en mm y la ETP también en mm ($Ia = P/ETP$). A partir de los datos del índice se clasifican las zonas áridas en cuatro grandes categorías

Clasificación	IA = P/ETP	Lluvia	Area superficie terrestre	
		(mm)	(%)	(Mha)
Hiperáridas	$AI < 0.05$	<200	7.5	1000
Áridas	$0.05 < AI < 0.20$	<200 (invierno) ó <400 (verano)	12.1	1620
Semiáridas	$0.20 < AI < 0.50$	200-500 (invierno) ó 400-600 (verano)	17.7	2370
Secas subhúmedas	$0.50 < AI < 0.65$	500-700 (invierno) ó 600-800 (verano)	9.9	1320



Distribución mundial de los desiertos (adaptado de UNEP 1997) libro geomorpholgy of deserts.. cap 1

d) Los más escépticos con los métodos de medición, cálculo y expresión de los índices anteriores, prefieren usar métodos indirectos, habitualmente una escala de medida biológica o indicadores ecológicos para dar una imagen de la aridez. Los trabajos en este sentido argumentan que los organismos vivos son más sensibles que los instrumentos meteorológicos y a su vez reflejan el efecto sinérgico de mucho elementos climáticos (trabajos de Boyko en Israel, o clasificación de Mayr y Pavari).

***Anexo II: Tabla de humedad relativa de equilibrio de
diferentes soluciones salinas saturadas***

Tabla de humedad relativa de equilibrio de diferentes soluciones salinas saturadas que indicaría el valor de la humedad relativa a diferentes temperaturas necesario para que se produzca la deliquesencia.

Temperature °C	Relative Humidity (%RH)					
	Potassium Carbonate	Magnesium Nitrate	Sodium Chloride	Potassium Chloride	Potassium Nitrate	Potassium Sulfate
0	43.13 ± 0.66	60.35 ± 0.55	75.51 ± 0.34	88.61 ± 0.53	96.33 ± 2.9	98.77 ± 1.1
5	43.13 ± 0.50	58.86 ± 0.43	75.65 ± 0.27	87.67 ± 0.45	96.27 ± 2.1	98.48 ± 0.91
10	43.14 ± 0.39	57.36 ± 0.33	75.67 ± 0.22	86.77 ± 0.39	95.96 ± 1.4	98.18 ± 0.76
15	43.15 ± 0.33	55.87 ± 0.27	75.61 ± 0.18	85.92 ± 0.33	95.41 ± 0.96	97.89 ± 0.63
20	43.16 ± 0.33	54.38 ± 0.23	75.47 ± 0.14	85.11 ± 0.29	94.62 ± 0.66	97.59 ± 0.53
25	43.16 ± 0.39	52.89 ± 0.22	75.29 ± 0.12	84.34 ± 0.26	93.58 ± 0.55	97.30 ± 0.45
30	43.17 ± 0.50	51.40 ± 0.24	75.09 ± 0.11	83.62 ± 0.25	92.31 ± 0.60	97.00 ± 0.40
35		49.91 ± 0.29	74.87 ± 0.12	82.95 ± 0.25	90.79 ± 0.83	96.71 ± 0.38
40		48.42 ± 0.37	74.68 ± 0.13	82.32 ± 0.25	89.03 ± 1.2	96.41 ± 0.38
45		46.93 ± 0.47	74.52 ± 0.16	81.74 ± 0.28	87.03 ± 1.8	96.12 ± 0.40
50		45.44 ± 0.60	74.43 ± 0.19	81.20 ± 0.31	84.78 ± 2.5	95.82 ± 0.45
55			74.41 ± 0.24	80.70 ± 0.35		
60			74.50 ± 0.30	80.25 ± 0.41		
65			74.71 ± 0.37	79.85 ± 0.48		
70			75.06 ± 0.45	79.49 ± 0.57		
75			75.58 ± 0.55	79.17 ± 0.66		
80			76.29 ± 0.65	78.90 ± 0.77		
85				78.68 ± 0.89		
90				78.50 ± 1.0		
95						
100						

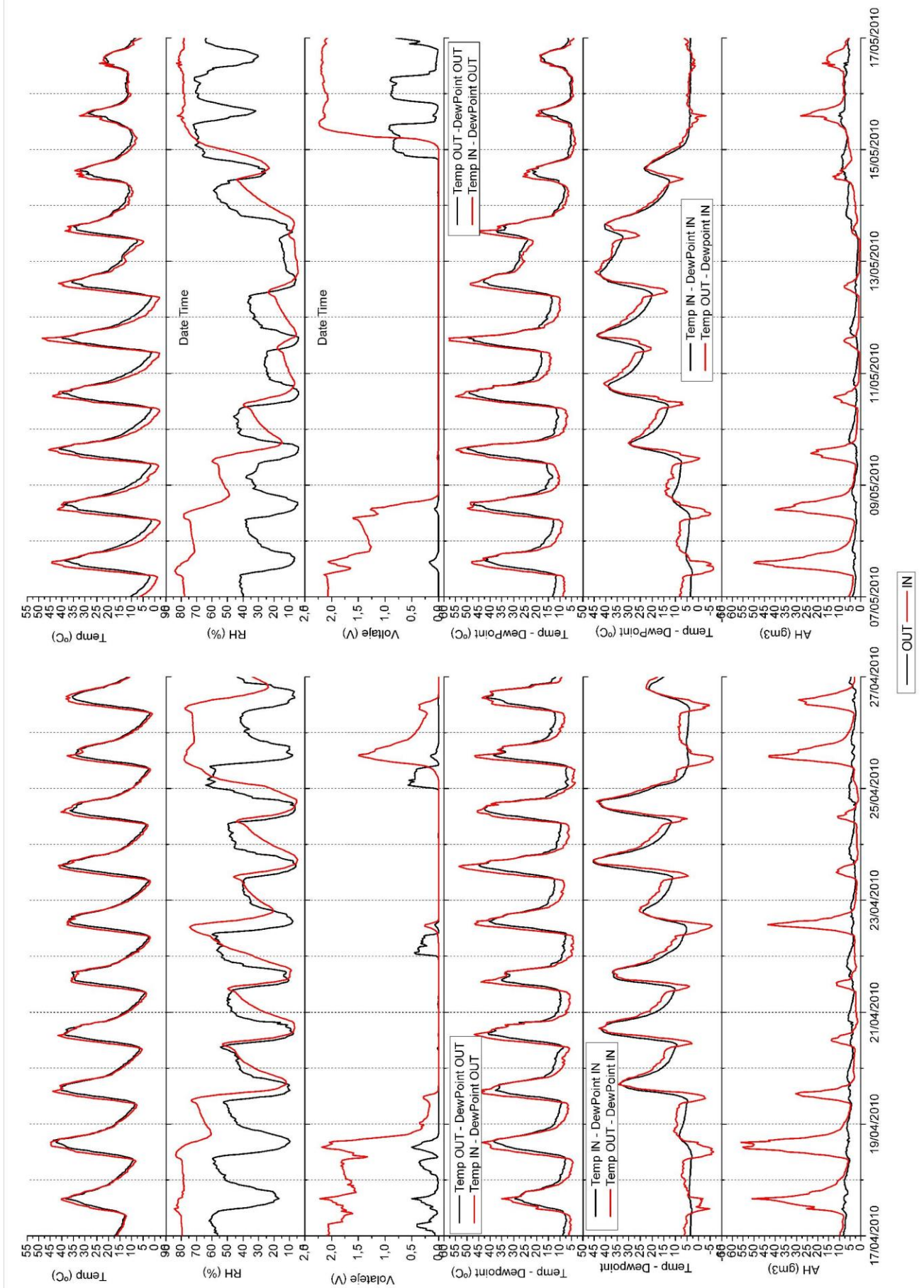
Anexo III: Medias diarias mensuales de T/HR
(abril 2009 - abril 2011)

Yungay													
Air Temperature (°C)													
Month	Daily Avg			Daily Max			Daily Min			Daily Osc			
	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	
Jan	22,31	0,90	11,10	19,72	39,32	1,42	35,74	43,53	10,33	1,41	7,70	13,67	33,82
Feb	23,14	1,12	10,53	17,25	38,58	1,89	35,00	43,50	13,01	1,56	10,12	16,82	32,21
Mar	21,30	1,04	6,20	19,21	39,16	1,56	35,42	44,53	9,27	1,48	6,33	13,14	34,73
Apr	19,81	1,91	9,32	17,39	38,28	2,33	30,42	43,86	8,00	2,92	2,02	13,93	37,49
May	15,65	1,84	11,49	20,60	34,17	4,18	22,47	41,15	4,23	3,43	2,69	12,78	39,48
Jun	13,57	1,68	14,44	20,46	34,38	3,24	25,16	40,63	0,75	2,05	0,49	5,54	39,80
Jul	11,81	2,40	17,49	23,13	33,36	4,25	19,39	40,57	-1,51	2,93	-2,06	7,47	42,25
Aug	14,59	1,57	18,96	22,93	36,07	4,43	17,99	43,19	0,70	1,46	0,33	5,28	42,86
Sep	16,26	1,78	19,52	24,02	37,07	3,79	24,61	45,06	2,04	1,81	2,14	5,90	45,74
Oct	18,20	1,32	20,82	25,79	38,06	2,59	30,77	42,24	3,90	1,41	3,92	8,10	38,71
Nov	20,03	1,20	18,68	23,81	38,27	2,76	31,66	44,41	6,57	1,54	6,15	10,76	37,15
Dec	21,08	0,95	15,73	22,96	38,84	1,88	35,08	43,83	8,12	1,35	8,34	10,98	36,48
Air Relative Humidity (%)													
Month	Daily Avg			Daily Max			Daily Min			Daily Osc			
	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	
Jan	48,67	6,32	31,87	58,44	64,71	9,17	44,80	84,90	12,43	2,61	7,30	18,50	71,30
Feb	50,51	4,47	40,15	58,60	64,97	6,77	46,60	72,80	17,61	4,28	8,80	24,60	83,40
Mar	49,37	5,75	36,78	60,56	62,24	6,75	42,10	73,80	12,63	2,94	7,70	21,60	63,50
Apr	43,32	8,64	21,64	59,00	60,48	8,94	34,20	74,40	13,17	4,37	5,60	26,70	82,90
May	42,36	11,24	18,56	62,15	57,95	15,05	25,90	81,30	12,48	8,33	3,90	31,70	83,30
Jun	35,01	8,30	16,68	56,26	53,04	16,64	24,50	88,70	7,08	3,16	3,20	17,20	78,30
Jul	32,68	9,54	14,54	54,01	47,44	13,82	24,10	78,10	6,96	4,79	2,30	28,10	80,30
Aug	31,21	10,89	14,62	64,77	51,24	16,98	21,70	87,90	6,97	6,44	2,50	41,50	71,80
Sep	33,75	9,57	15,35	52,17	54,90	15,46	23,90	88,60	6,13	3,42	2,30	20,50	72,40
Oct	31,04	8,50	14,40	49,01	53,88	13,67	27,40	85,40	6,49	2,42	3,30	16,40	62,40
Nov	35,14	10,38	17,39	54,78	60,52	14,03	35,30	88,00	8,96	3,34	4,00	17,80	63,20
Dec	41,36	7,62	21,38	52,01	64,69	9,88	41,70	80,30	10,03	3,18	5,30	17,00	59,90

Llamará													
Air Temperature (°C)													
Month	Daily Avg			Daily Max			Daily Min			Daily Osc			
	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	
Jan	22,29	1,66	20,15 28,41	40,75	2,16	37,21 45,91	9,69	2,80	5,15 16,44	31,06	2,91	24,76 36,64	
Feb	23,64	1,41	19,29 26,64	41,18	2,49	35,80 46,35	13,47	2,60	8,20 19,98	27,71	3,34	21,09 34,55	
Mar	20,58	0,99	18,30 22,84	40,67	2,89	31,00 45,00	8,19	1,76	4,92 13,69	32,48	3,96	19,58 39,40	
Apr	19,36	2,13	13,35 23,27	38,16	3,15	32,15 43,31	8,20	2,78	1,51 13,31	29,96	4,14	20,98 36,31	
May	15,73	1,79	12,86 20,13	34,77	3,68	26,38 41,15	4,25	3,73	-3,07 11,76	30,52	6,45	19,88 43,81	
Jun	12,63	1,35	7,95 15,08	33,85	3,26	26,74 39,18	-0,16	2,59	-7,87 4,66	34,01	4,84	23,27 42,23	
Jul	11,37	2,36	5,82 18,06	32,65	3,29	25,60 39,57	-1,71	3,47	-9,99 6,31	34,36	5,21	20,81 45,25	
Aug	13,42	1,24	11,02 16,58	35,40	3,54	24,24 42,00	-0,74	2,34	-4,32 5,59	36,14	5,35	19,47 45,06	
Sep	15,50	1,90	10,82 19,95	36,57	3,10	26,82 42,56	1,53	2,64	-5,33 8,20	35,03	4,44	22,33 45,22	
Oct	17,07	1,54	13,53 20,46	37,85	2,48	28,12 42,39	2,10	2,00	-1,30 7,17	35,75	2,99	26,56 40,64	
Nov	18,81	1,23	15,79 21,71	38,07	2,02	33,29 42,42	4,58	2,50	0,25 9,73	33,50	3,22	25,63 40,50	
Dec	20,22	1,15	18,06 22,18	38,27	1,75	33,21 42,68	6,81	2,32	2,02 13,45	31,47	3,05	21,68 36,25	
Air Relative Humidity (%)													
Month	Daily Avg			Daily Max			Daily Min			Daily Osc			
	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum Maximum	
Jan	47,94	5,65	28,54 55,82	75,02	5,67	52,41 82,95	13,73	3,27	5,38 21,05	61,29	5,78	44,56 77,56	
Feb	50,24	5,64	33,92 60,90	73,21	6,61	56,16 83,05	17,98	5,06	7,45 28,14	55,23	6,39	40,84 67,42	
Mar	51,46	5,93	37,88 64,90	76,19	5,54	60,49 86,40	14,81	5,79	4,16 35,26	61,38	5,71	45,63 75,40	
Apr	55,36	6,21	40,33 65,05	78,19	5,41	58,78 87,40	17,64	5,48	9,06 29,91	60,55	6,54	41,94 71,93	
May	56,38	8,30	38,88 69,71	81,20	4,11	69,88 89,71	16,54	9,49	4,02 37,60	64,66	9,54	46,77 83,18	
Jun	54,88	9,03	31,42 70,95	83,00	6,06	59,10 92,24	10,59	5,56	4,13 28,41	72,41	6,65	53,03 83,75	
Jul	53,76	10,31	19,68 67,78	81,10	8,81	32,73 90,90	10,09	5,73	3,07 30,79	71,02	9,52	25,18 83,02	
Aug	49,91	10,95	17,08 67,62	79,98	9,99	34,47 90,61	8,72	6,29	2,90 30,75	71,27	10,20	31,57 83,45	
Sep	50,76	7,20	30,40 65,60	82,00	5,94	62,97 92,07	9,66	5,26	1,41 29,35	72,34	7,77	50,68 85,12	
Oct	48,09	7,06	26,27 59,61	80,54	4,96	62,97 90,43	8,26	3,80	2,74 21,51	72,28	5,72	57,66 83,74	
Nov	50,47	5,26	34,22 59,41	80,23	4,34	60,11 88,12	11,19	5,53	3,34 25,08	69,04	6,22	52,15 82,94	
Dec	51,00	5,20	37,59 59,11	79,34	3,44	67,44 87,52	13,57	5,05	5,16 27,70	65,77	5,56	51,57 78,25	

SG North														
Air Temperature (°C)														
Month	Daily Avg			Daily Max			Daily Min			Daily Osc				
	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation
Jan	25,16	0,99	22,19	27,66	41,13	2,92	34,47	47,13	15,67	1,33	12,73	19,22	25,46	3,45
Feb	25,90	1,06	23,46	28,17	40,49	2,36	35,08	45,91	17,90	1,39	15,10	21,37	22,59	2,85
Mar	22,86	1,08	20,51	25,44	38,00	2,85	30,07	44,29	14,27	1,25	12,10	16,87	23,73	3,54
Apr	21,35	2,06	17,04	24,83	35,41	2,72	27,95	40,49	14,49	2,21	9,16	18,37	20,92	3,16
May	17,99	1,81	15,32	22,64	31,56	2,82	25,23	36,96	11,39	2,16	7,09	16,25	20,17	2,93
Jun	15,39	1,23	11,64	18,53	29,70	2,82	24,68	38,92	8,61	1,56	3,22	11,22	21,08	3,15
Jul	14,19	1,70	9,72	17,75	28,43	2,60	23,09	33,47	7,37	2,27	2,13	12,24	21,06	3,10
Aug	15,37	1,32	12,49	18,66	30,85	3,07	25,65	40,40	7,80	1,66	4,27	11,37	23,05	3,64
Sep	17,38	1,64	13,89	22,07	33,07	3,01	23,42	38,53	9,42	1,69	5,41	12,46	23,65	3,29
Oct	19,46	1,43	15,90	23,09	36,38	2,38	29,19	40,43	10,37	1,62	6,84	13,55	26,01	2,59
Nov	22,21	0,98	20,61	24,21	39,50	2,80	34,65	45,94	12,35	2,05	8,87	16,70	27,16	4,31
Dec	23,81	1,18	21,09	26,67	40,39	2,96	34,86	45,91	13,85	1,87	10,32	17,68	26,53	4,25
Air Relative Humidity (%)														
Month	Daily Avg			Daily Max			Daily Min			Daily Osc				
	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation
Jan	46,81	4,04	37,11	52,50	70,33	4,14	57,36	77,07	16,81	4,01	6,49	25,90	53,52	5,30
Feb	47,45	4,39	35,14	54,32	67,79	5,36	55,56	75,23	19,84	4,22	6,84	25,49	47,95	6,04
Mar	51,24	5,58	37,60	62,67	72,00	4,51	51,48	76,64	20,49	5,30	7,29	34,33	51,52	5,82
Apr	56,92	5,45	41,81	70,24	74,37	4,08	59,29	79,29	24,12	4,77	14,59	40,36	50,25	5,52
May	59,04	5,22	44,32	66,50	76,58	2,22	72,35	81,13	25,82	5,96	10,99	38,65	50,76	6,09
Jun	60,84	5,36	42,96	68,14	78,23	2,76	68,57	82,83	25,08	5,88	9,26	35,89	53,15	5,15
Jul	60,32	6,00	29,82	67,94	78,26	3,77	56,86	83,43	24,65	6,31	7,26	41,61	53,61	6,18
Aug	58,30	6,38	31,22	68,03	77,96	2,31	71,37	82,61	21,72	6,63	4,76	35,36	56,24	5,98
Sep	56,70	3,81	45,78	65,22	77,15	2,20	71,09	81,71	20,65	5,22	5,46	37,59	56,50	5,47
Oct	52,82	3,95	39,36	59,29	75,77	1,84	71,77	80,71	17,01	4,39	1,89	27,60	58,76	4,79
Nov	50,40	3,07	40,55	56,26	74,43	2,44	66,96	80,25	15,90	3,97	5,40	22,97	58,53	5,39
Dec	48,67	3,20	40,44	55,51	72,96	2,12	66,08	76,57	16,02	4,31	3,70	24,49	56,93	5,01

Anexo IV: Semanas secas en Yungay



"Lo último que uno sabe es por dónde empezar"

(Blaise Pascal)

